UNTERSUCHUNGEN ZUM ROHPROTEIN-, METHIONIN- UND LYSINGEHALT DER SAMEN EINIGER MUTANTEN UND REKOMBINANTEN VON PISUM SATIVUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

IRIS GROTE

aus

BONN

BONN 1976

UNTERSUCHUNGEN ZUM ROHPROTEIN-, METHIONIN- UND LYSINGEHALT DER SAMEN EINIGER MUTANTEN UND REKOMBINANTEN VON PISUM SATIVUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

IRIS GROTE

aus

BONN

BONN 1976

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H.-P. Müller
2. Referent: Prof. Dr. W. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Institut für Genetik der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. W. Gottschalk

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung	4
2. Methoden	9
2.1. Hydrolyse der Proteine	9
2.2. Mikrobiologische Aminosäurebestimmung	10
2.2.1. Testorganismen	11
2.2.2. Methionin- und Lysinbestimmung	14
2.2.3. Auswertung	17
2.3. Berechnung von Standard- und Testgeraden	21
2.4. Zuverlässigkeit der Methode	26
2.5. Praktische Anwendbarkeit der Methode	29
3. Methoden zur statistischen Auswertung der Ergebnisse	32
3.1. Berechnung der Schätzwerte	32
3.2. Varianzanalyse	33
3.3. Regressions- und Korrelationsanalyse	38
4. Samenmaterial	41
5. Ergebnisse	45
5.1. Trockengewicht der Samen	45
5.2. Rohproteingehalt der Samen	46
5.3. Methioningehalt der Samen	52
5.4. Lysingehalt der Samen	59
5.5. Methionin- und Lysingehalt der Samen in Bezug auf den Rohproteingehalt	62
5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen	65
5.7. Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen bezogen auf die Pflanze	69
6. Diskussion	89
7. Zusammenfassung	103
8. Literaturverzeichnis	105

1. Einleitung

Untersuchungen an induzierten Mutanten sind im Hinblick auf ihre Bedeutung für die allgemeine Genetik, die Evolution und die züchterische Verbesserung von Kulturpflanzen von großem Interesse. Besonders der letzte Aspekt ist vor allem zum Zwecke der besseren Proteinversorgung bei den für die menschliche und tierische Ernährung so wichtigen Samen dieser Pflanzen von Bedeutung. Einige Zahlen sollen die Wichtigkeit pflanzlicher Proteine generell und die der Leguminosen im besonderen unterstreichen. In den Jahren 1964 bis 1966 wurden von der Erdbevölkerung 109 Millionen Tonnen Protein verbraucht. Allein 84 Millionen Tonnen waren davon pflanzlichen Ursprungs. Aus Leguminosensamen (ohne Sojabohnen) stammten 6 Millionen Tonnen; das sind 5,4 % des Gesamtverbrauchs. Vergleichsweise dazu wurden 8,1 Millionen Tonnen des Proteinkonsums durch Milch gedeckt. Der Anteil an Leguminosensamen am Verbrauch pflanzlicher Proteine - wiederum ohne Sojabohnen - liegt bei 7,1 % und damit nach Getreide (72 %) und Ölsamen mit Sojabohnen und Erdnüssen (9,5 %) an dritter Stelle (BORGSTROM 1967).

Züchterische Bestrebungen können sowohl auf die Verbesserung von Proteinqualität als auch auf -quantität ausgerichtet sein. Die Qualität der Pflanzenproteine - und natürlich auch der tierischen - ist abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins. Speziell der Gehalt an essentiellen Aminosäuren bestimmt die "Biologische Wertigkeit" des Proteins. Dieses Kriterium gibt Aufschluß über die Eignung eines Nahrungsproteins zur Biosynthese von Körpereiweiß tierischer und menschlicher Organismen und entspricht der Anzahl an Gramm Körpereiweiß, die durch 100 g des betreffenden Nahrungsproteins ersetzt werden können (LANG 1970, KOFRÁNYI 1970). Begrenzender Faktor ist die sogenannte limitierende Aminosäure, womit die essentielle Aminosäure gemeint ist, die in diesem Protein in geringster Menge vorkommt. Bei Leguminosen ist es Methionin, bei Getreide Lysin (LANG 1970, KOFRÁNYI 1970). Aus diesem

Grunde spielt die Aminosäure Lysin in der Pflanzenzüchtung und vor allem in der Getreidezüchtung eine so große Rolle. Durch die Selektion von Getreidesorten mit einem hohen Lysingehalt wird eine Qualitätsverbesserung des Proteins erreicht.

Verbesserungen in der Versorgung mit Eiweiß können auch durch die Ausnutzung von Ergänzungswirkungen verschiedener Proteine erreicht werden. Wie schon angedeutet, ist beispielsweise Lysin bei Getreide und Methionin bei Leguminosen limitierende Aminosäure. Umgekehrt ist aber Methionin in Getreide- und Lysin in Erbsenprotein in höherem Maße vorhanden. Dadurch haben diese beiden Nahrungsmittel einen guten Ergänzungswert; die biologische Wertigkeit der Proteine aus dem Gemisch wird verbessert (KOFRÁNYI 1970).

Voraussetzung für die züchterische Bearbeitung einer Kulturpflanze mit dem Ziel der quantitativen und qualitativen Proteinverbesserung ist eine genetische Variabilität des Protein- und Aminosäuregehaltes. Zahlreiche Untersuchungen haben bewiesen, daß die Unterschiede im Gehalt an Protein zwischen verschiedenen Variätäten und Stämmen einiger Pflanzenarten neben Umwelteinflüssen (wie beispielsweise Düngung) auch auf die Wirkung genetischer Faktoren zurückzuführen sind (ROEMER, RUDORF 1958). Durch Mutation kann der polygen vererbte Proteingehalt (MÜLLER 1973) von Samen geändert werden.

Die Aminosäurezusammensetzung des Samenproteins kann auch durch einzelne mutierte Gene geändert werden. NELSON (1969) hat dies an zwei Maismutanten gezeigt. Die floury-2 und opaque-2 Mutanten wiesen einen der Stammform gegenüber stark erhöhten Methioningehalt auf. Außerdem war der Lysingehalt positiv verändert. Ähnliche Verhältnisse liegen bei den von MUNCK et. al. (1969) beschriebenen Stamm der Gerste (hiproly) vor. Untersuchungen von SCHÖN (1970), die ebenfalls an Gerste durchgeführt wurden, deuten auf ähnliche Ergebnisse hin, wie sie auch NELSON (1969) bei den Maismutanten gewonnen hatte. Demnach ist die Veränderung im Gehalt an Aminosäure dadurch bedingt, daß unter Einfluß der mutierten Gene sich die Anteile

der verschiedenen Proteinfraktionen innerhalb der Samenproteine verschieben. So wird bei den Maismutanten die Synthese der Prolaminfraktion unterdrückt, während die der Albumin- und Globulinfraktionen vermehrt werden. SCHÖN (1970) wies nach, daß die Albumine und Globuline der Gerste eine geringere genetische Variabilität zeigen als die beiden anderen Proteinfraktionen. Die Gluteline zeigten eine bessere Aminosäurezusammensetzung als die Prolamine, eine Verbesserung der Proteinqualität kann also durch Selektion solcher Samen erreicht werden, deren Protein eine zugunsten der Gluteline erniedrigte Prolaminfraktion aufweisen.

In dieser Untersuchung sollen nicht die Proteinfraktionen des Samenproteins der Erbse analysiert werden, sondern die Arbeit muß sich auf die anteilmäßige Bestimmung zweier Aminosäuren am Rohproteingehalt der Erbsensamen beschränken.

Der Protein- und Aminosäuregehalt von Erbsensamen ist zwar generell bekannt, aber bei den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich in der Regel um Werte von "Durchschnittserbsensamen" (beispielsweise LANG 1970). Um die Samen verschiedener Erbsensorten vergleichen zu können, müssen die Gehalte an Protein und Aminosäuren vorliegen.

Zur Beantwortung der Frage der genetisch bedingten Proteinsynthese eignen sich besonders Mutanten und Rekombinanten, die sich von der Ausgangsform in einem oder mehreren mutierten Genen, deren Wirkung bekannt ist, unterscheiden. Den Samen höherer Pflanzen wird in diesem Zusammenhang besondere Bedeutung zugemessen, da hier die Pflanze mit ihrer gesamten genetischen Information in einem bestimmten Zustand fixiert ist. Physiologisch gesehen ist der Samen weitgehend inaktiviert. Bei der biochemischen Analyse fallen demnach eine Reihe von Faktoren weg, die in keimenden Samen und wachsenden Pflanzenteilen wegen der ständig dort ablaufenden stofflichen Umsetzungen mit berücksichtigt werden müßten. Die Samen können folglich als relativ einheitliches Versuchsmaterial angesehen werden (MÜLLER 1973). Zur Bestimmung des Aminosäuremusters der Prote-

ine sind sie daher besonders geeignet. Voraussetzung ist allerdings ein geeignetes Selektionsverfahren, bei dem außer labortechnischen Methoden auch umweltbedingte, feldtechnische und zuchtmethodische Wirkungen gleichermaßen zu berücksichtigen sind. In dieser Arbeit wird eine geeignete Methode zur Bestimmung ausgewählter Aminosäuren dargestellt.

Für die Untersuchung der Samen von Pisum sativum und einigen ihrer Mutanten und Rekombinanten wurden die Aminosäuren Methionin und Lysin ausgesucht. Ihr Anteil am Samenprotein ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. Methionin und Lysin sind für Mensch und Tier essentielle Aminosäuren. Lysin ist als basische Aminosäure sehr stabil und daher gut nachweisbar. Methionin zählt zu der Gruppe der schwefelhaltigen Aminosäuren. Der Methioningehalt gibt bei Leguminosen gleichzeitig Auskunft über die biologische Wertigkeit des Samenproteins. Da diese Aminosäure nur in geringen Mengen vorkommt und außerdem leicht zerstörbar ist, kommt der Eignung der Methode besondere Bedeutung zu.

Aus den bisherigen Ausführungen kann für die vorliegende Arbeit folgendes Untersuchungsziel konkretisiert werden:

- Zur exakten Erfassung der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge an Aminosäure muß ein geeignetes Verfahren gefunden werden, das ausreichend empfindlich ist und dessen Ergebnisse reproduzierbar sind. Für die Anwendung bei Serienversuchen muß die Methode standardisierbar sein.
- Die anfallenden Ergebnisse sollen unter Verwendung verschiedener statistischer Methoden analysiert werden. Ziel ist es dabei, die signifikanten von den zufälligen Unterschieden zu trennen. Dadurch werden die Aussagen über den Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen von untersuchten Genotypen abgesichert.
- Aus den ermittelten Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschieden bei den untersuchten Mutanten und Rekombinanten sollen Erkenntnisse über Zusammenhänge und Beziehungen zwischen Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt dargestellt

und diskutiert werden.

Entsprechend der Zielsetzung ist die Arbeit gegliedert. Der erste Teil befaßt sich mit der mikrobiologischen Aminosäurebestimmung. Diesem Kapitel schließt sich die Darstellung statistischer Auswertungsverfahren an. Nach der Charakterisierung der untersuchten Genotypen folgt die Darstellung der Ergebnisse, die im letzten Teil der Arbeit interpretiert und diskutiert werden.

2. Methoden

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden durch mikrobiologische Aminosäurebestimmungen gewonnen. Wie für nahezu alle Analysemethoden dürfen die Aminosäuren auch hier nicht in der Peptidkette gebunden vorliegen. Voraussetzung für die Aminosäurebestimmung ist die Freisetzung der Aminosäuren durch Hydrolyse.

2.1. Hydrolyse der Proteine

Eine Hydrolyse von Proteinen kann mit Säuren, Alkalien oder Enzymen durchgeführt werden. Die am häufigsten angewandte Methode ist die saure Hydrolyse, die sich auch für die mikrobiologische Methionin- und Lysinbestimmung als am zweckmäßigsten erweist. Die gebräuchlichsten Reagenzien sind Salz- oder Schwefelsäure. Durch Verwendung von H_2SO_4 gewinnt man die freien Aminosäuren, während durch die Hydrolyse mit HCl die Hydrochloride erhalten werden (KOIL und ŠORMOVA 1965).

Während der Vorversuche zeigte sich in Übereinstimmung mit den Angaben von BLOCK (1956), BARTON-WRIGHT (1952) und HORN et al. (1955), daß die Hydrolyse mit Salzsäure für die eigenen Untersuchungen am geeignesten ist, da sie weniger Fehlerquellen enthält. Außerdem ist es für die mikrobiologische Aminosäurebestimmung gleichgültig, ob die Aminosäuren frei oder in Form von Hydrochloriden vorliegen. Um die Zersetzung instabiler Aminosäuren, wie beispielsweise Cystein und Methionin, zu verhindern, wird das Hydrolysiermittel in großem Überschuß zugesetzt; auf 1 mg Eiweiß kommt 1 ml Säure (KOIL und ŠORMOVA 1965).

Das in den eigenen Untersuchungen angewandte Verfahren der sauren Hydrolyse mit 2,5 N HCl geht auf BARTON-WRIGHT (1952) und HORN et al. (1955) zurück. Zu bemerken ist, daß nach Angabe der Autoren Methionin nicht zerstört wird und auch bei Lagerung des Hydrolysates in der Tiefkühltruhe für einen Monat

keine Verluste auftreten (HORN et al. 1955). Das ist insofern von Bedeutung, weil gerade das Methionin im Gegensatz zum Lysin eine Aminosäure ist, die äußerst leicht zerstört wird. Eine Bestimmung des Methioningehaltes ist in der Regel mit Schwierigkeiten verbunden. Hinzu kommt, daß diese Aminosäure in den meisten Proteinen nur in sehr geringen Mengen enthalten (SMITH 1966) und eine schonende Hydrolysiermethode daher ganz besonders wichtig ist.

Die Proteinhydrolysate wurden wie folgt nach den Angaben der bereits erwähnten Autoren hergestellt:
Das zu untersuchende Samenmaterial wird mit Hilfe eines Multimix zu Samenmehl zerkleinert. Eine wichtige Voraussetzung für die vollständige Hydrolyse ist, daß ein feines homogenes Mehl hergestellt wird.
125 mg Samenmehl werden in 25 ml einer 2,5 N HCl suspendiert (ca. 1 mg Protein pro ml 2,5 N HCl). Diese Suspension wird in einem zugeschmolzenen Reagenzglas im Autoklaven bei 121°C über 8 Stunden hydrolysiert. Nach dem Abkühlen werden dem Hydrolysat 2 ml 2,5 M Natriumacetatlösung zugesetzt und der pH-Wert auf 4,5 mit 25 N Natriumhydroxidlösung eingestellt. Diese Lösung wird filtriert, um die in diesem pH-Bereich ausfallenden Humine auszufällen. Sie können nämlich aufgrund ihrer wachstumsfördernden Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen zu Fehlern in der Analyse führen. Der pH-Wert des Filtrats wird mit 2,5 N NaOH auf 6,8 eingestellt, das Volumen des Hydrolysats durch Zusatz von Aqua bidest auf 50 ml aufgefüllt und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.
Die Konzentration des Hydrolysats beträgt 2,5 mg Probe pro ml.

2.2. Mikrobiologische Aminosäurebestimmung

Die mikrobiologische Analysetechnik erfordert bestimmte Voraussetzungen, die von SCHOFFER (1949) und KRETZSCHMAR (1968) zusammengestellt wurden. Am bedeutungsvollsten ist dabei die Empfindlichkeit des Mikroorganismus bezüglich der zu analysierenden Aminosäure. Sie ist der Maßstab für den Genauigkeits-

grad der Bestimmung, der im allgemeinen bei 1 - 5 % liegt.

2.2.1. Testorganismen

Als Testorganismen zum Nachweis von Aminosäuren werden in erster Linie Milchsäurebakterien verwendet (KRETZSCHMAR 1968). Vor allem sind es Lactobacteriaceae, eine morphologisch zwar uneinheitliche, physiologisch aber relativ gut übereinstimmende Gruppe. Zur Energiegewinnung sind sie durchweg auf Kohlenhydrate angewiesen und scheiden Milchsäure aus.

Darüber hinaus ist diese Gruppe dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Glukose und NH_4 als Stickstoffquelle wachsen, sondern sehr komplexe Wuchsstoffansprüche stellen. Die Milchsäurebakterien synthetisieren Aminosäuren nur schwach und benötigen außerdem eine Reihe von Vitaminen, vor allem solche der B-Gruppe. Zur Kultivierung sind daher äußerst komplexe Nährmedien notwendig, die relativ große Mengen Hefeextrakt enthalten. Hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung zeigte sich, daß 19 Aminosäuren, ferner Zucker, Phosphat, Fe^{++}, Mg^{++} und Mn^{++}, Acetat und die Basen Adenin, Guanin und Uracil wie auch Vitamine enthalten sein müssen. Dabei sind die relativen Konzentrationen oft kritisch. Die komplexen Nährstoffansprüche der Milchsäurebakterien sind in Tabelle 1 dargestellt. Die benötigten Nährstoff- und Salzkonzentrationen variieren sehr.

Es ist klar, daß das Fehlen eines dieser Stoffe im Medium dazu benutzt werden kann, Aminosäuren und Vitamine zu bestimmen. Die Lactobacteriaceae sind aus diesem Grund zu echten "Laboratoriumsreagenzien" geworden (THIMANN 1964). Durch das Weglassen eines Bestandteiles des Mediums (z.B. einer Aminosäure) und das Zugeben einer zu untersuchenden Substanz - die diesen Bestandteil enthält - in abgestuften Mengen, bewirkt, daß die Bakterien auch unterschiedlich, d.h. je nach Konzentration des zu bestimmenden Bestandteiles, wachsen. Die Stärke des Wachstums ist dann ein Maß für die Menge an z. B. Aminosäure, die in dem zu untersuchenden Material enthalten ist.

Tabelle 1: Synthetisches Medium für Milchsäurebakterien

Zusammensetzung	Endkonzentration in mg / l
Nährstoffe	
Glucose	10000
Natriumacetat	6000
Salze als 2 Salzgemischlösungen zugegeben	
NH_4Cl	2500
$(NH_4)_2SO_4$	2500
KH_2PO_4	500
K_2HPO_4	500
NaCl, $FeSO_4$, und $MnSO_4$, je	5
Aminosäuren	
Arginin, Cystin, Glycin, Histidin, Oxiprolin, Prolin, Tryptophan und Tyrosin, je	200
Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Norleucin, Phenylalanin, Serin, Threonin und Valin, je	100
Glutamin	25
Purine und Pyrimidine	
Adenin, Guanin und Uracil, je	10
Vitamine	
Pyridoxamin HCl	0,4
Riboflavin, Thiamin, Niacin, und Pantothensäure, je	0,2
Para-aminobenzoesäure	0,04
Folsäure	0,02
Biotin	0,0002

(Aus National Dairy Research Lab. Manual 1949; in: THIMANN 1964 Seite 476)

Die verschiedenen Milchsäurebakterien haben jeweils einen ganz speziellen Aminosäurebedarf. Die mikrobiologische Methode ist daher höchst empfindlich, sowohl für die einzelenen Aminosäuren als auch für die optische Konfiguration spezifisch. Das bedeutet, von einem Bakterienstamm wird selektiv entweder die L-Form oder die D-Form der Aminosäure verwertet, nur einige Bakterien sind in der Lage, beide Formen der Aminosäuren für ihren Stoffwechsel auszunutzen. Bestimmt werden kann daher mit Hilfe verschiedener Stämme die L-Form, die D-Form oder das Ge-

misch aus beiden Aminosäureformen. In Tabelle 2 wird ein Überblick über den Aminosäurebedarf einiger Milchsäurebakterien gegeben und gezeigt, welches Bakterium zur Analyse bestimmter Aminosäuren geeignet ist.

Tabelle 2: Aminosäurebedarf einiger Milchsäurebakterien

Aminosäure	Mikroorganismus						
	LM	SF	LA	LB	LC	LD	LF
Alanin	o	+	o	o	x	+	-
Arginin	x	x	o	+	+	+	-
Asparaginsäure	x	o	o	+	o	o	-
Cystin	x	o	o	+	+	+	-
Phenylalanin	o	o	+	+	+	+	+
Glutaminsäure	x	+	x	+	+	+	+
Glycin	x	o	-	+	+	-	-
Histidin	x	+	-	+	+	-	o
Isoleucin	x	x	+	+	+	+	+
Leucin	x	x	+	+	+	+	+
Lysin	x	x	o	+	-	o	-
Methionin	x	x	+	+	o	-	+
Oxyprolin	-	-	-	-	-	-	-
Prolin	o	-	-	o	-	-	-
Serin	o	o	-	o	+	+	-
Threonin	+	x	o	+	+	-	o
Tryptophan	x	x	+	+	+	+	+
Tyrosin	x	+	o	+	x	+	+
Valin	x	x	+	+	+	+	+

\+ = essentielle Aminosäure
x = der Organismus wurde sehr oft zur Bestimmung verwendet oder ist aus anderen Gründen geeignet
o = wird dann benutzt, wenn die Aminosäure von einigen Autoren als essentiell, von anderen als nicht essentiell befunden wurde
\- = die Abwesenheit der Aminosäure im Nährboden ist nicht durch Wachstumsverminderung feststellbar

LM = Leuconostoc mesenteroides P 60 (ATCC 8042)
SF = Streptococcus faecalis R (ATCC 9790, 8043)
LA = Lactobacillus arabinosus 17-5 (ATCC 8014)
LB = Lactobacillus brevis (ATCC 8257)
LC = Lactobacillus citrovorum (ATCC 8081)
LD = Lactobacillus delbrückii LD-5 (ATCC 9595)
LF = Lactobacillus fermenti 36 (ATCC 9338)

(nach KEIL, ŠORMOVA 1965 Seite 534)

Im Zusammenhang mit der kurzen Charakterisierung der Testorganismen soll auch auf die Wachstumsmessung bei den hier beschriebenen Bakterien hingewiesen werden. Zwei Methoden sind möglich, die acidimetrische und die turbidimetrische. Da die Lactobacteriaceae gute Säureproduzenten sind, die Bakterienzellen aber leicht verklumpen, ist die acidimetrische Methode hier geeigneter. Sie beruht auf der Titrierung der produzierten Milchsäure - ein für Serienuntersuchungen aufgrund der Einfachheit und Genauigkeit gut durchführbares Meßverfahren.

Die Acidimetrie hängt von der Menge der produzierten Säure ab, die als Endprodukt des Energiewechsels anfällt (THIMANN 1964, KRETZSCHMAR 1968). Dabei laufen Wachstumsrate und Säureproduktion nicht genau parallel. Das maximale Wachstum ist wesentlich früher erreicht als die maximale Säureproduktion. Aus diesem Grund muß die Inkubation über einen längeren Zeitpunkt erfolgen. Die Bestimmung der Wachstumsrate erfolgt durch End-pH-Messung und Ermittlung der gebildeten Säuremenge aus einer Titrationskurve oder durch einfache Titration von Hand aus oder schließlich mittels automatischer Titrier- und Registrierapparate (KRETZSCHMAR 1968). In den beiden folgenden Abschnitten soll das Verfahren der mikrobiologischen Methionin- und Lysinbestimmung beschrieben werden.

2.2.2. Methionin- und Lysinbestimmung

Die mikrobiologische Methionin- und Lysinbestimmung geht, wie sie für diese Untersuchung angewandt wurde, auf BARTON-WRIGHT (1952), BLOCK und WEISS (1956), GREENSTEIN und WINITZ (1961), HORN et al. (1947), LYMAN et al. (1945) und SNELL (1945) zurück. Beschrieben werden die Schritte, die nach der Hydrolyse des zu untersuchenden Materials für die Aminosäurebestimmung notwendig sind.

Testorganismus
Das Milchsäurebakterium Streptococcus faecalis 9760
(zu beziehen über die American Type Culture Collection oder das Institut für Mikrobiologie, Göttingen)

Grundnährlösung (doppelte Konzentration)

Aminosäuren	DL-Alanin	200 mg
	L-Arginin·HCl	200 mg
	DL-Asparaginsäure	200 mg
	L-Cystin	200 mg
	L-Glutaminsäure	100 mg
	Glycin	200 mg
	L-Histidin·HCl·H_2O	200 mg
	DL-Isoleucin	200 mg
	DL-Leucin	200 mg
	L-Lysin·HCl+	100 mg
	DL-Methionin+	200 mg
	DL-Phenylalanin	200 mg
	L-Prolin	200 mg
	DL-Serin	200 mg
	DL-Threonin	200 mg
	DL-Tryptophan	400 mg
	L-Tyrosin	200 mg
	D-Valin	200 mg
	+ die zu bestimmende Aminosäure ist aus dem Medium herauszulassen	
Nährstoffe	Glucose (wasserfrei)	10 g
	Natriumacetat·$3H_2O$	10 g
Vitamine	Biotin	0,2 µg
	Ca-d-Pantothenat	200 µg
	Folsäure	2 µg
	Nicotinsäure	200 µg
	Pyridoxin·HCl	1460 µg
	p-Aminobenzoesäure	40 µg
	Riboflavin	200 µg
	Thiamin·HCl	200 µg
org. Basen	Adeninsulfat·H_2O	5 mg
	Guanin·HCl·$2H_2O$	5 mg
	Uracil	5 mg
	Xanthin	5 mg
Salze	Salzlösung A	5 ml
	Salzlösung C	2 ml
Aqua bidest	q.s.	500 ml
pH		6,8

Anorganische Salzlösungen

Salzlösung A

KH_2PO_4	25 g
K_2HPO_4	25 g
Aqua bidest	250 ml

Um eine Ausfällung in der Lösung zu verhindern, werden Salzlösung C einige Tropfen konz. HCl zugegeben.

Salzlösung C

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
NaCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,5 g
Aqua bidest	250 ml

Vorbereitung des Impfmaterials

Eine Stammkultur von Streptococcus faecalis wird auf Schrägröhrchen gehalten, deren Nährboden folgende Zusammensetzung aufweist:

1,0 % Glucose
0,5 % Bacto Tryptone
1,5 % Agar
0,6 % wasserfreies Natriumacetat
1,5 ml % Salzlösung A
0,2 ml % Salzlösung C
pH 6,8

Lagerung nach Bebrüten bei 4° - 8°C, die Stammkultur wird alle vier Wochen umgesetzt.

Anzucht einer Kultur für die Analyse

Von der Stammkultur wird eine Impföse Bakterien in eine Nährlösung (NL) gleicher Zusammensetzung (s.o. ohne Agarzusatz) übergeimpft. Das Röhrchen wird 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Danach werden die Zellen abzentrifugiert (15 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute), mit 10 ml Aqua bidest resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Mit 10 ml sterilem Aqua bidest wird die Suspension zum Beimpfen hergestellt. Jedes Reagenzglas wird mit einem Tropfen beimpft.

Standardkurve

Streptococcus faecalis 9760 reagiert auf L-Methionin in einem Bereich von 0 - 40 µg, bei Lysin in einer Konzentration von 0 - 200 µg. Für die Standardkurven werden daher die Konzentrationen wie folgt gewählt:

für Methionin: 0, 8, 16, 24, 32, 40 µg / 10 ml NL
für Lysin : 0, 40, 80, 120, 160, 200 µg / 10 ml NL

Analyse

5 ml der doppelt konzentrierten Grundnährlösung werden in Reagenzgläser gegeben und nach entsprechender Verdünnung unterschiedliche Mengen des Hydrolysats bzw. der Methionin- oder Lysinstandardlösung hinzugefügt. Der Inhalt der Reagenzgläser wird mit Aqua bidest auf 10 ml ergänzt. Die Röhrchen werden mit Zellstoffstopfen verschlossen und im Autoklaven bei 121°C 12 bis 15 Minuten lang sterilisiert (SCHLEGEL 1972). Nach

langsamem Abkühlen im Autoklaven - dies ist notwendig, um Ausfällungen zu verhindern - werden die Röhrchen beimpft und 72 Stunden bei 37°C bebrütet.
Die Menge der produzierten Säure wird durch Titration mit 0,02 N NaOH bestimmt. Als Indikator dient Bromthymolblau - 0,1 g in 16 ml 0,01 N NaOH gelöst und mit Aqua bidest auf 250 ml verdünnt. Fünf Tropfen Bromthymollösung werden in jedes Röhrchen gegeben; titriert wird bis zum grünblauen Umschlagspunkt.

Aus den Titrationswerten werden Standard- und Testkurven für jede Aminosäure aufgestellt. Die Auswertung wird im folgenden Kapitel beschrieben.

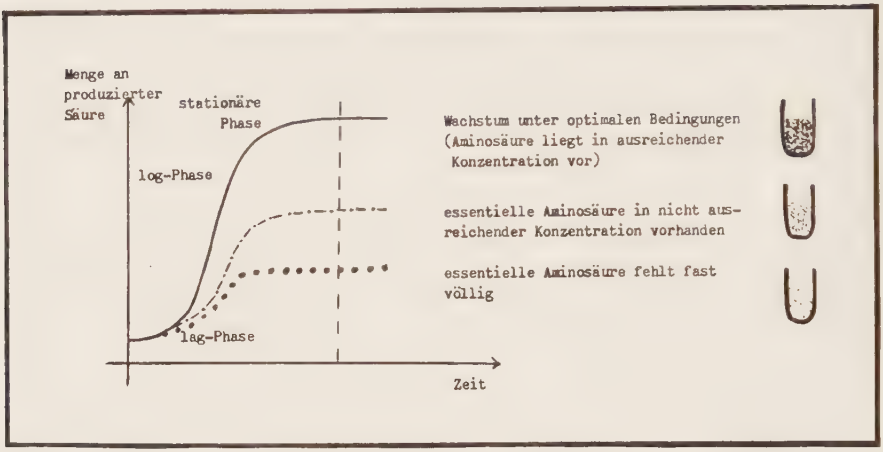
2.2.3. Auswertung

Die Auswertung der mit der mikrobiologischen Methode erhaltenen Resultate beruht darauf, daß bei den zur Aminosäureanalyse verwendeten Milchsäurebakterien die Säureproduktion ein direkter Maßstab für die Wachstumsintensität ist.
Das Wachstum wiederum ist abhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums. Die maximale Vermehrungsrate kann nur erreicht werden, wenn die Nährlösung alle Komponenten in optimaler ausreichender Zusammensetzung enthält. Fehlt ein essentieller Metabolit oder ist in nicht ausreichender Menge vorhanden, so reagieren die Organismen mit vermindertem Wachstum darauf. Das gilt entsprechend für essentielle Aminosäuren. Die folgenden Darstellungen (nach eigenen Befunden aus Vorversuchen) sollen diese Zusammenhänge verdeutlichen.

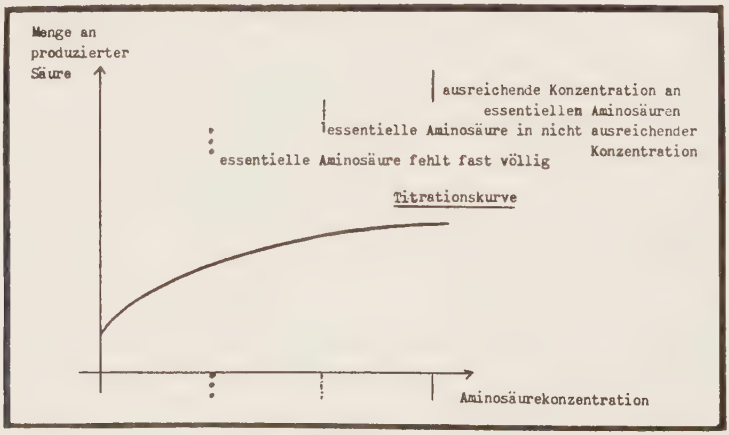
Je höher die Konzentration der essentiellen Aminosäure in dem Nährmedium ist, desto besser ist die Wachstumskurve (Säureproduktion) der des optimalen Wachstums (der optimalen Säureproduktion) angeglichen.

Die Titrationskurve zeigt die produzierten Säuremengen bei unterschiedlicher Aminosäurekonzentration in der stationären Phase.

Wachstumsintensität bei unterschiedlicher Aminosäurekonzentration = Säureproduktion bei unterschiedlicher Aminosäurekonzentration



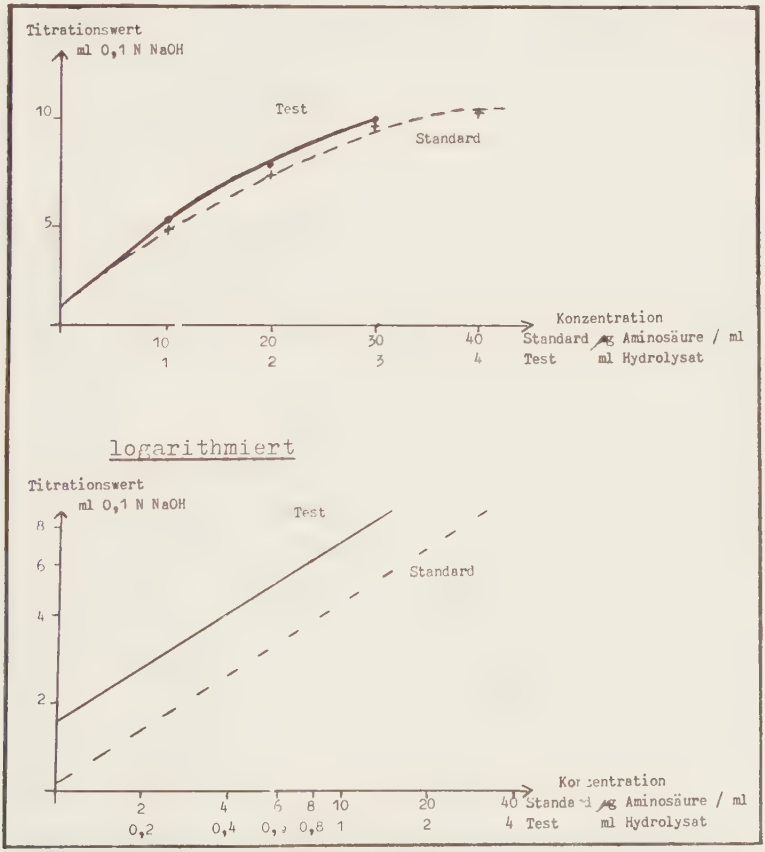
Produzierte Säuremenge in der stationären Phase bei Nährmedien mit unterschiedlicher Aminosäurekonzentration



Die Aufstellung der Standard- und Testkurven erfolgte nach den

Angaben bei GREENSTEIN und WINITZ (1961), BLOCK und WEISS (1956) und BARTON-WRIGHT (1952). Wird das Wachstum der Bakterienpopulation, ausgedrückt als produzierte Säuremenge, gegen die Konzentration der reinen Aminosäure bzw. der Testsubstanz in ein Koordinatensystem übertragen, so erhält man Standard- und Testkurven. Zur Erleichterung der Berechnungen werden beide Achsen logarithmiert und damit die Kurven in Geraden transformiert. Die folgende Darstellung macht die Zusammenhänge deutlich.

Standard- und Testkurven



(nach GREENSTEIN, WINITZ 1961 Seite 1262)

Zu beachten ist, Standard- und Testgerade müssen parallel verlaufen, d.h. den gleichen Anstieg haben. Ist dies nicht der Fall, muß auf einen Fehler in der Analyse geschlossen werden.

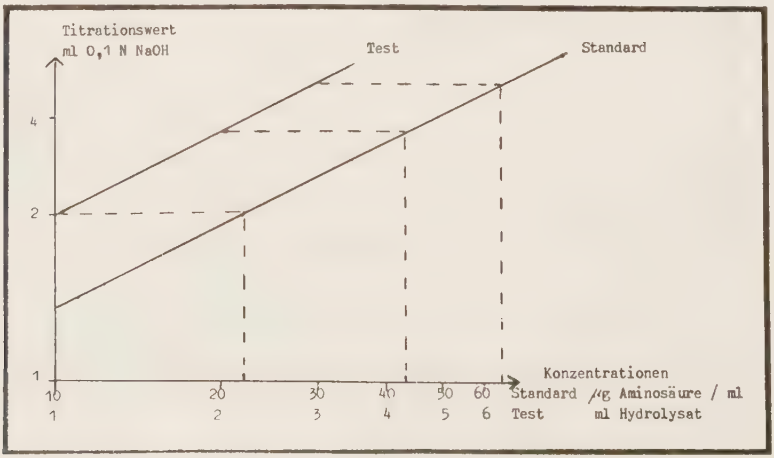
Für die Standardgerade werden sechs verschiedene Aminosäurekonzentrationen benötigt, das Hydrolysat wird in vier unterschiedlichen Konzentrationsstufen in die Teströhrchen gegeben, jede in vierfacher Ausfertigung.

Der Aminosäuregehalt der zu bestimmenden Substanz errechnet sich wie folgt:

1. von der Testlinie zur Standardlinie wird in einigen Punkten (in der Regel 4 bis 7) eine Parallele zur x-Achse gezogen,
2. im Schnittpunkt der Testgeraden mit dieser Parallelen wird parallel zur y-Achse eine Linie gezeichnet,
3. im Schnittpunkt dieser Linie mit der x-Achse kann abgelesen werden, wieviel µg Aminosäure in den hier stehenden ml Testsubstanz enthalten sind.

Der Aminosäuregehalt der zu testenden Substanz ist in verschiedenen Punkten zu messen und wird als arithmetisches Mittel der aus dem Diagramm abgelesenen Werte ausgewiesen. Das folgende Beispiel erläutert die Auswertung der Titrationsergebnisse.

Auswertung der Titrationsergebnisse



Aus dem Diagramm kann als Ergebnis abgelesen werden (die Werte wurden willkürlich gewählt):
1 ml Hydrolysat enthält 22 µg Aminosäure
2 ml Hydrolysat enthalten 44 µg Aminosäure
3 ml Hydrolysat enthalten 66 µg Aminosäure
durchschnittlicher Aminosäuregehalt pro ml Hydrolysat: 22 µg

2.3. Berechnung von Standard- und Testgeraden

In der mir vorliegenden Literatur über mikrobiologische Bestimmungsmethoden ist über eine Berechnung der Standard- und Testgeraden sowie über die Prüfung der Übereinstimmung der Steigung nichts ausgesagt. Da ein einfaches Verbinden der Punkte zu willkürlich und damit ungenau ist, mußte die Frage nach einer Berechnungsmöglichkeit und damit weiterer Standardisierung der Methode gestellt werden.

Zwischen Aminosäurekonzentration und Titrationswert besteht ein funktionaler Zusammenhang. Daher ist es möglich, die Regressionsrechnung anzuwenden. Da im logarithmischen Bereich die Funktion linear ist (GREENSTEIN und WINITZ 1961), wurden die Meßwerte transformiert. Die Berechnung der Standard- und Testgeraden kann daher nach folgender Gleichung erfolgen (SACHS 1972):

Gleichung einer Regressionsgeraden

$$y = \bar{y} + b\,(x - \bar{x})$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i y_i - \bar{y}\sum_{i=1}^{n} x_i}{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - \bar{x}\sum_{i=1}^{n} x_i}$$

x_i = Konzentrationen log ml Test bzw. Standard

y_i = Titrationswerte log ml NaOH

Da die Berechnung von Standard- und Testgeraden von allgemeiner Bedeutung ist (z.B. Proteinbestimmung nach Lowry oder mit Nesslers Reagenz), soll im folgenden kurz anhand eines Bei-

spiels auf die Berechnung eingegangen werden.

Konzentrationen und Titrationswerte

Standard Konzentration: 10 µg Aminosäure pro ml
Titration mit 0,02 N NaOH

Konzentration ml AS-Lösung	Titrationswert ml 0,02 N NaOH
1	4,00
2	6,60
3	7,90
4	11,00
5	13,00

Test Konzentration: 2,5 mg Probe pro ml
Titration mit 0,02 N NaOH

Konzentration ml Hydrolysat	Titrationswert ml 0,02 N NaOH
1	5,00
2	8,30
3	11,00
4	13,75

Berechnung der Standardgeraden (Formel s.O.)

x_i	y_i	$x_i \cdot y_i$	x_i^2	
0,00000	0,60206	0,000000	0,000000	
0,30103	0,81954	0,246706	0,090619	
0,47712	0,89763	0,428277	0,227643	
0,60206	1,04139	0,626979	0,362476	
0,69897	1,11394	0,778610	0,488559	
2,07918	4,47456	2,080572	1,169297	Summe
0,415836	0,894912			Mittelwert

$$b = \frac{2,080572 - 0,894912 \cdot 2,07918}{1,169297 - 0,415836 \cdot 2,07918}$$

$$b = 0,721657$$

$$y = 0,894912 + 0,721657 (x - 0,415836)$$

$$\underline{y = 0,594822 + 0,721657x}$$

Berechnung der Testgeraden (Formel s.O.)

x_i	y_i	$x_i \cdot y_i$	x_i^2	
0,00000	0,69897	0,000000	0,000000	
0,30103	0,91908	0,276670	0,090619	
0,47712	1,04139	0,496867	0,227643	
0,60206	1,13830	0,685324	0,362476	
1,38021	3,79774	1,458861	0,680738	Summe
0,34505	0,949435			Mittelwert

$$b = \frac{1,458861 - 0,949435 \cdot 1,38021}{0,680738 - 0,34505 \cdot 1,38021}$$

$$b = 0,725888$$

$$y = 0,949435 + 0,725888 (x - 0,34505)$$

$$y = 0,698968 + 0,725888x$$

Die berechneten Standard- und Testgeraden werden auf doppelt logarithmischem Papier in ein Koordinatenkreuz eingetragen - Darstellung siehe Seite 24.

Aus dem Diagramm können folgende Ergebnisse abgelesen werden (die Werte des Beispiels wurden willkürlich gewählt):

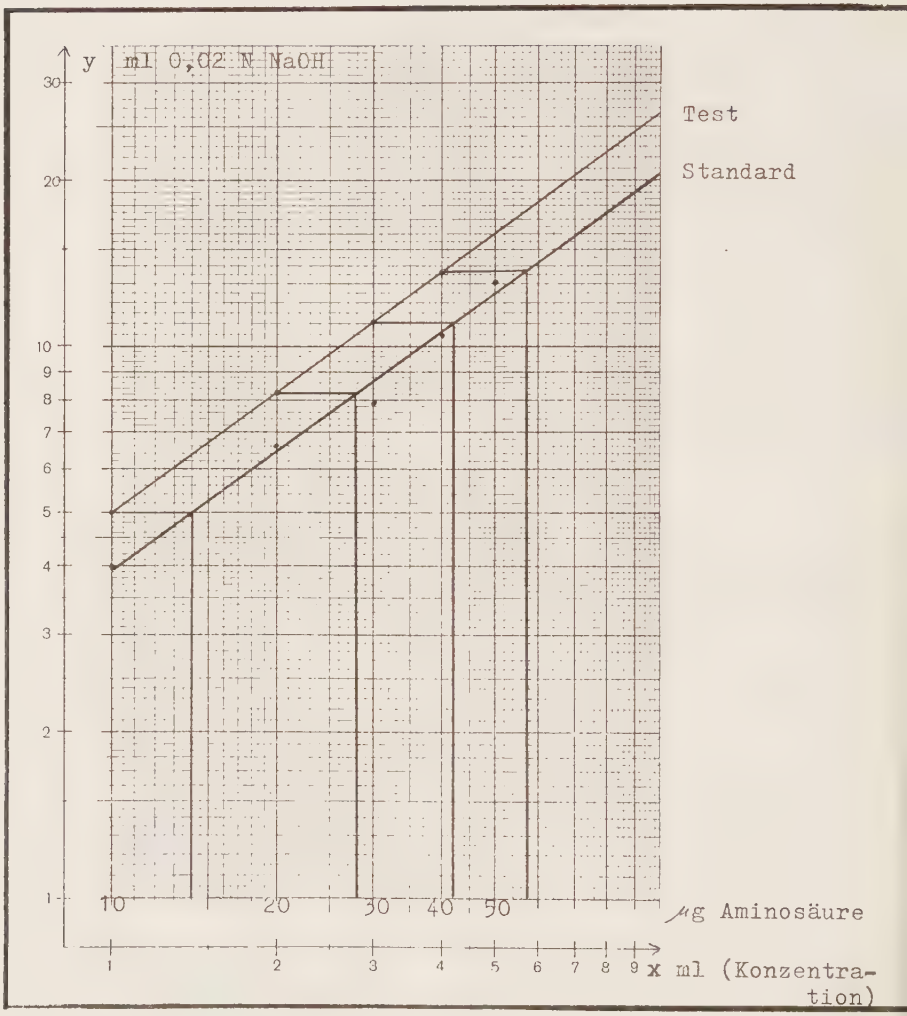
1 ml Hydrolysat enthält 14 µg Aminosäure
2 ml Hydrolysat enthalten 28 µg Aminosäure
3 ml Hydrolysat enthalten 42 µg Aminosäure
5 ml Hydrolysat enthalten 57 µg Aminosäure

Der durchschnittliche Aminosäuregehalt pro ml Hydrolysat beträgt 14,0625 µg.

Das sind bei einer Konzentration von 2,5 mg Probe pro ml Hydrolysat 562,5 µg Aminosäure pro 100 mg Probe.

Der Test auf Übereinstimmung der Regressionskoeffizienten, d.h. der Steigung der Standard- und Testgeraden, sollte dann angewendet werden, wenn Zweifel darüber besteht, ob die Differenz zwischen den berechneten Regressionskoeffizienten noch als

Standard- und Testgerade



zufällig angesehen werden kann. Die hier angewendete Prüfgröße beruht auf dem t-Test (SACHS 1972) und lautet wie folgt.

Test auf Übereinstimmung von Regressionskoeffizienten

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s^2_{y_1 x_1}(n_1 - 2) + s^2_{y_2 x_2}(n_2 - 2)}{n_1 + n_2 - 4} \cdot \left(\frac{1}{Q_{x_1}} + \frac{1}{Q_{x_2}}\right)}}$$

$$FG = n_1 + n_2 - 4$$

wobei: $Q_x = \sum_{i=1}^{n}(x - \bar{x})^2$ $\qquad Q_y = \sum_{i=1}^{n}(y - \bar{y})^2$

$$s_x = \sqrt{\frac{Q_x}{n-1}} \qquad s_y = \sqrt{\frac{Q_y}{n-1}}$$

$$s^2_{y.x} = (s_y^2 - b_{yx}^2 \cdot s_x^2) \cdot \frac{n-1}{n-2}$$

Der Test ist zweiseitig.

Bei dem obigen Beispiel ist die Übereinstimmung der Regressionskoeffizienten offensichtlich; zur Erläuterung der Formel soll hier aber der Einfachheit halber mit den Werten des Beispiels gerechnet werden - Berechnung siehe Seite 26.

Da der Tabellenwert größer als der berechnete Wert für t ist, kann mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von in diesem Fall 99 % angenommen werden, daß die beiden Regressionsgeraden die gleiche Steigung haben. Wäre der Tabellenwert kleiner als der berechnete, müßte von einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Regressionskoeffizienten ausgegangen und somit auf einen Fehler in der Analyse geschlossen werden.

Berechnungen zum Test auf Übereinstimmung von Regressionskoeffizienten

Standard	Test
$Q_{x_1} = 1{,}169297 - \frac{1}{5}4{,}322989$	$Q_{x_2} = 0{,}680738 - \frac{1}{4}1{,}904980$
$= 0{,}304699$	$= 0{,}204493$
$Q_{y_1} = 4{,}165217 - \frac{1}{5}20{,}021687$	$Q_{y_2} = 3{,}713487 - \frac{1}{4}14{,}422829$
$= 0{,}160880$	$= 0{,}107780$
$s_{x_1}^2 = 0{,}076175$	$s_{x_2}^2 = 0{,}068164$
$s_{y_1}^2 = 0{,}040220$	$s_{y_2}^2 = 0{,}035927$

$$s_{x_1y_1}^2 = (0{,}040220 - 0{,}520789 \cdot 0{,}076175)\ \frac{4}{3} = 0{,}000732$$

$$s_{x_2y_2}^2 = (0{,}035927 - 0{,}526913 \cdot 0{,}068164)\ \frac{3}{2} = 0{,}000017$$

$$t = \frac{0{,}004231}{0{,}060373} = 0{,}070081$$

$$t_{0{,}0005;5} = 6{,}869$$

2.4. Zuverlässigkeit der Methode

Es ist schwierig, die Zuverlässigkeit einer Methode zu definieren, da sie von einer Reihe von Faktoren bestimmt wird, die je nach Art der Fragestellung unterschiedlich ins Gewicht fallen. SACHS (1972) gibt als wichtigste Zuverlässigkeitskriterien folgende an:

- Spezifität
  Die Erfassung einer bestimmten chemischen Substanz mit Ausschluß anderer.
- Richtigkeit
  Die exakte quantitative Erfassung der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge (unter Vermeidung sy-

stematischer Fehler!). Kontrolliert wird die Richtigkeit durch drei einfache Methoden:

1. Vergleichsversuche
   Vergleich der Methode durch Parallelbestimmungen mit einer möglichst zuverlässigen Methode.
2. Zusatzversuche
   Dem Untersuchungsmaterial werden bekannte Mengen der Analysesubstanzen zugefügt.
3. Mischversuche
   Untersuchungsmaterial mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration der Analysensubstanz wird in verschiedenen Verhältnissen gemischt.

- Präzision, Genauigkeit oder Reproduzierbarkeit
  Die Erfassung des zufälligen Fehlers der Bestimmungsmethode mit neuen Reagenzien, an verschiedenen Tagen, durch verschiedene Personen und in verschiedenen Laboratorien, anhand der Variationsbreite, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten: liegt der Variationskoeffizient über 5, so sind Doppelt- oder auch Dreifachbestimmungen notwendig. Bei Dreichfachbestimmungen sei davor gewarnt, den etwas abseits liegenden Wert zu verwerfen;fast stets wird hierdurch die Richtigkeit der Bestimmung beeinträchtigt. Größere Abweichungen der Werte voneinander sind gar nicht so selten!
- Empfindlichkeit
  Der geringste auffindbare Betrag, der sich signifikant von 0 unterscheidet.
- Praktische Bewährung
  über eine längere Zeitdauer. Hierzu gehören die Themen: Schwierigkeitsgrad, apparativer Aufwand, Zeitbedarf, Kosten.

Die mikrobiologische Bestimmungsmethode ist durch eine sehr hohe Spezifität ausgezeichnet. Die einzelnen Milchsäurebakterien, die für die Bestimmung gebraucht werden, haben einen ganz speziellen Aminosäurebedarf, die Methode ist daher sowohl für die einzelnen Aminosäuren, als auch für die optische Konfiguration - L-Form - spezifisch (KEIL und ŠORMOVA 1965, THIMANN 1964, LYMAN et al. 1946).

Die Richtigkeit dieser Methode wurde schon 1945 von SNELL durch Zusatzversuche festgestellt. Für die Methioninbestimmung mit Streptococcus faecalis untersuchten LYMAN et al. (1946) die Rückgewinnungsrate. Es wurde festgestellt, daß bei unterschiedlichen Versuchen eine Rückgewinnung von 97 % bis 102 % gegeben war. Ebenso ergaben diese Versuche, daß der Gehalt des Untersuchungsmaterials an Glycin die Genauigkeit der Methode nicht beeinträchtigt. Nach THIMANN (1964) kann allerdings ein zu hoher Gehalt an Glutaminsäure zu Wachstumshemmungen der Bakterien führen.

Ein Vergleich der mikrobiologischen Methode mit chemischen Verfahren ergab, daß die erhaltenen Werte durchaus vergleichbar sind (LYMAN et al. 1946, KRETZSCHMAR 1968, SCHWERDTFEGER 1968, LICHTENSTEIN 1971, BLOCK und WEISS 1956).

Um eine Aussage über die Genauigkeit oder Reproduzierbarkeit der mikrobiologischen Methode machen zu können, wurde der Gesamtfehler (= zufälliger Fehler + systematischer Fehler) nach MC FARREN und Mitarbeitern (zitiert nach SACHS 1972) berechnet. Der Vertrauensbereich für μ bei $\alpha = 0{,}05$ konnte nach YOUDEN (zitiert nach SACHS 1972) bestimmt werden. Es ergab sich für die Methioninbestimmung ein Gesamtfehler von 0,93 % bis 6,86 % und für die Lysinbestimmung konnten 1,09 % bis 8,28 % festgestellt werden. Die Werte zeigen, daß die Methode sehr gut ist, da der Gesamtfehler unter 25 % liegt (SACHS 1972). Eine Methode ist, sobald der Gesamtfehler über 50 % liegt, kaum noch brauchbar.

Auch die Empfindlichkeit der Methode kann berechnet werden; und zwar durch Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze. WILSON (zitiert nach SACHS 1972) und ROSS (zitiert nach SACHS 1972) haben hierzu die entsprechende Formel entwickelt. Danach ergibt sich - Risiko I = Risiko II = 0,05 - für die Methioninbestimmung $B_u = 1{,}54\ \mu g$ und für die Lysinbestimmung $B_u = 2{,}44\ \mu g$, d.h. dies ist die Menge, die in der Probe mindestens vorhanden sein muß, um durch die mikrobiologische Methode analysiert werden zu können.

Im Zusammenhang mit der Zuverlässigkeit einer Methode muß auch auf die Anzahl der Wiederholungen eingegangen werden, die zur Absicherung der Ergbnisse notwendig sind. Die Berechnung des notwendigen Stichprobenumfanges, d.h. der Anzahl der notwendigen Wiederholungen, wurde nach SACHS (1972) vorgenommen. Es ergab sich, daß für die Methioninbestimmung 3 - 4 Untersuchungen und für die Lysinbestimmung 6 - 7 bei einer zulässigen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0{,}01$ auf 1 % genau ausreichend sind.

2.5. Praktische Anwendbarkeit der Methode

Die zur Zeit gebräuchlichsten mikrobiologischen Untersuchungsmethoden sind in der Regel so einfach in Bezug auf ihre Handhabung, daß ein einmal für die Analyse einer Aminosäure ausgearbeitetes Verfahren auf die Bestimmung aller anderen übertragen werden kann, wenn die entsprechenden Bedingungen eingehalten werden.

In den letzten 15 Jahren hat sich die Analyse der Aminosäuren stürmisch entwickelt. Dieser Fortschritt war durch die Ausarbeitung analytischer Mikromethoden auf völlig neuen Grundlagen ermöglicht worden. Eine besondere Rolle haben dabei die chromatographischen, mikrobiologischen, enzymatischen und Isotopenreaktionen gespielt. Während die älteren Methoden, hauptsächlich Isolierungsmethoden, zur Bestimmung der Aminosäure oft 100 g und mehr an Eiweiß erforderten, reichen für die neuen Methoden einige Milligramm aus. Zur vollständigen Hydrolysatanalyse mittels mikrobiologischer Methoden braucht man weniger als 100 mg Eiweiß.

Die mikrobiologischen Methoden eignen sich vor allem für rasche, serienmäßig ausgeführte Routineanalysen. Sie sind höchst empfindlich, sowohl für die einzelne Aminosäure als auch für die optische Konfiguration spezifisch, schnell und nicht kostspielig (KEIL und ŠORMOVA 1965).

Um einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren zu geben und die Stellung der mikrobiologischen Analysetechnik innerhalb dieser deutlich zu machen, sei Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Für die einzelnen Aminosäuren geeignete Analysemethoden

Aminosäure	Isotopenverdünnung	Mikrobiologische Verfahren	Chromatographie	Kolorimetrie	Decarboxylasen	Quantitative Isolierung	Oxydation
Alanin	+	+	+				+
Arginin	+	+	+	+	+	+	
Asparaginsäure	+	+	+			+	+
Cystein				+			+
Cystin		+		+			+
Glutaminsäure	+	+	+		+	+	+
Glycin	+	+					
Histidin		+	+	+	+	+	
Isoleucin		+	+				
Leucin	+	+	+				
Lysin	+	+	+		+	+	
Methionin		+	+	+			
Phenylalanin	+	+	+	+			
Oxyprolin					+		
Oxylysin							+
Prolin	+	+	+				
Serin		+					+
Threonin		+					+
Tryptophan		+		+			
Tyrosin	+	+	+	+	+		
Valin		+	+				

(KEIL, ŠORMOVA 1965 Seite 550)

KEIL und ŠORMOVA (1965) geben für die mikrobiologische Methode eine Genauigkeit von ± 8 % an. Dieser Wert dürfte durch die Untersuchungen von SCHWERDTFEGER (1968) und LICHTENSTEIN (1971) widerlegt worden sein. Aus diesen Arbeiten geht eindeutig hervor, daß zwischen der chromatographischen und der mikrobiologischen Aminosäurebestimmung in Bezug auf die Genauigkeit kein Unterschied besteht. Das bedeutet, daß die mikrobiologische Methode ebenfalls mit einem Fehler von ± 2 % arbeitet und damit im gleichen Fehlerbereich wie die anderen Methoden liegt. Die eigenen Untersuchungen bestätigen dies, wie Kapitel 2.4. zeigt.

Die Eigenart der mikrobiologischen Methodik gestattet es, eine einzelne Aminosäure gleichzeitig und unter völlig gleichen Bedingungen in einer ganzen Reihe von Untersuchungsproben zu bestimmen. Wieviel Proben gleichzeitig untersucht werden können, hängt in erster Linie von der personellen Besetzung ab; eine Kraft kann bis zu 20 Proben je Ansatz bearbeiten.

Vergleicht man den erforderlichen apparativen Aufwand, so schneidet die mikrobiologische Verfahrenstechnik um vieles günstiger ab als die anderen gebräuchlichen Analysetechniken zur Aminosäurebestimmung. Hier werden nur Reagenzgläser mit Kappen, ein Sterilisierautoklav, ein Brutschrank, eine Analysenwaage, eine Kleinzentrifuge sowie diverse Pipetten und Büretten benötigt - Gerätschaften, die in den meisten Laboratorien ohnehin vorhanden sind. So belaufen sich z.B. die Kosten für den Methioninnachweis in einer Probe bei vierfacher Wiederholung auf 1,08 DM (die Abschreibung der Geräte ist dabei nicht berücksichtigt).

Die mikrobiologische Methode ist immer dort mit Vorteil einzusetzen, wo selten oder wo in einem großen Untersuchungsmaterial eine oder wenige Aminosäuren zu bestimmen sind (SCHWERDTFEGER 1968).

3. Methoden zur statistischen Auswertung der Ergebnisse

Besonders in der Genetik sind statistische Methoden außerordentlich wichtig, weil damit das gewonnene biometrische Material auf eine solide Grundlage gestellt wird, von der aus fundierte Schlußfolgerungen gezogen werden können (DRUMBAKER 1967).
Die Methoden wurden zusammengestellt nach ZIMMERMANN (1959), LINDER (1964), PFLANZAGL (1968), RASCH (1970), SACHS (1972) und WEILING (1972), Tabellen wurden der angegebenen Literatur entnommen sowie ZIMMERMANN (1959) und MÜLLER (1970).

3.1. Berechnung der Schätzwerte

Zur Charakteristik eines Datenmaterials sind bestimmte Schätzwerte notwendig, die eine Aussage über die vorliegenden Ergebnisse erlauben. Hier sollen zur Kennzeichnung der gewonnenen Daten Durchschnitt (= arithmetisches Mittel, auch oft einfach als Mittelwert bezeichnet), Varianz, Variationskoeffizient und etwas weiter führend der Vertrauensbereich des Mittelwertes aufgeführt werden.

Der Durchschnitt ist definiert als die Summe der die Elemente einer Gesamtheit kennzeichnenden Daten dividiert durch die Anzahl der Elemente in der Gesamtheit:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

x_i = Elemente der Gesamtheit
n = Anzahl der Elemente der Gesamtheit

Die Varianz ist die Summe der Abweichungsquadrate (Abweichung = Differenz zwischen den Einzelrealisationen und dem Durchschnitt der Stichprobe) dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade (FG = n - Anzahl der geschätzten Parameter). Die Wurzel aus der Varianz wird als Standardabweichung bezeichnet:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{1}{n - 1}\left[\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^{n} x_i\right)^2\right]$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

Der Variationskoeffizient dient insbesondere dem Vergleich von Stichproben eines Grundgesamtheittyps. Er ist ein relativ dimensionsloses Streumaß mit dem Mittelwert als Einheit, häufig auch als Standardabweichung in Prozenten des arithmetischen Mittels angegeben:

$$v = \frac{s}{\bar{x}}$$

$$v\% = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

In nicht zu kleinen Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten dürfte v% nicht größer als 33 % sein.

Der Vertrauensbereich des Mittelwertes, auch als Vertrauensintervall oder Konfidenzbereich des Mittelwertes bezeichnet, ist ein aus Stichprobenwerten berechnetes Intervall, das den wahren, aber unbekannten Parameter mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit, der Vertrauenswahrscheinlichkeit, überdeckt. Diese, meist wird 95 % gewählt, besagt, daß in etwa 95 % der Fälle die Vertrauensbereiche den Parameter überdecken und ihn in 5 % nicht erfassen. Mit einer statistischen Sicherheit S liegt der gesuchte Parameter zwischen den Vertrauensgrenzen:

$$\bar{x} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n'}} \quad \text{mit} \quad t_{n-1,\,\alpha/2}$$

Der Test ist zweiseitig, da sowohl die obere wie die untere Vertrauensgrenze bestimmt werden soll.

3.2. Varianzanalyse (einfache Klassifikation)

Die Varianzanalyse ermöglicht einen Vergleich der Mittelwerte mehrerer Stichproben. Dabei können die Umfänge der k Stichpro-

ben verschieden sein. Festgestellt werden soll, ob die Mittelwerte dieser k Stichproben unterschiedlich hoch sind oder ob die Differenzen zwischen den Mittelwerten nur zufällig sind.

Bei der Varianzanalyse wird davon ausgegangen, daß die Mittelwerte nur zufällig voneinander verschieden sind (= O-Hypothese). Das bedeutet, alle Stichprobengruppen entstammen der gleichen Grundgesamtheit. Ist dies der Fall, dann sollten $s^2_{innerhalb}$ und $s^2_{zwischen}$ ungefähr gleich groß sein, d.h. die Summe der Abweichungsquadrate um die Gruppenmittelwerte dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade gleich der Summe der Abweichungsquadrate der Gruppenmittelwerte um das Gesamtmittel dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade sein.

Gegeben sind also k Stichprobengruppen mit n_i Stichprobenelementen, die Anzahl der Stichprobenelemente insgesamt ist demnach

$$n = \sum_{i=1}^{k} n_i$$

Die Gruppenmittelwerte $\bar{x}_i$ sind gegeben durch

$$\bar{x}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}$$

und das Gesamtmittel $\bar{x}$ durch

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{k} n_i \cdot \bar{x}_i$$

wobei i die Stichprobengruppe kennzeichnet und j die einzelnen Glieder dieser Stichprobe.

Die Summe der Abweichungsquadrate der Stichprobenwerte um das Gesamtmittel ($Q_{insgesamt}$) läßt sich in zwei Teile zerlegen :

1. Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen ($Q_{innerhalb}$)
2. Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen ($Q_{zwischen}$)

d.h.

$$Q_{insgesamt} = Q_{innerhalb} + Q_{zwischen}$$

$$\sum_{ij}(x_{ij}-\bar{x})^2 = \sum_{ij}(x_{ij}-\bar{x}_i)^2 + \sum_{i} n_i(\bar{x}_i-\bar{x})^2 \qquad \text{mit den zugehörigen}$$

$$n - 1 = (n - k) + (k - 1) \qquad \text{Freiheitsgraden (FG)}$$

Die Varianzen (= Summe der Abweichungsquadrate dividiert durch die Anzahl der Freiheitsgrade) werden in der Varianzanalyse auch als mittlere Quadrate bezeichnet:

$$s^2_{innerhalb} = \frac{1}{n-k}\sum_{ij}(x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$ (Versuchsfehler bzw. mittleres Quadrat des Versuchsfehlers)

$$s^2_{zwischen} = \frac{1}{k-1}\sum_{i} n_i(\bar{x}_i - \bar{x})^2$$ (Stichprobenfehler bzw. mittleres Quadrat des Stichprobenfehlers)

Die O-Hypothese lautet (s.o.), alle Stichprobengruppen entstammen der gleichen Grundgesamtheit, $s^2_{innerhalb}$ und $s^2_{zwischen}$ sollten ungefähr gleich groß sein. Ist dies nicht der Fall, d.h. ist der Quotient aus $s^2_{zwischen}$ und $s^2_{innerhalb}$ größer als der durch durch $FG_1 = k-1$, $FG_2 = n-k$ und α festgelegte kritische Wert der F-Verteilung, so befindet sich unter den Stichprobengruppen mindestens eine, die einen von den anderen Gruppen verschiedenen Mittelwert aufweist, also nicht zu der gleichen Grundgesamtheit gehört; die O-Hypothese muß abgelehnt werden.

Die Prüfgröße der Varianzanalyse lautet:

$$\hat{F} = \frac{s^2_{zwischen}}{s^2_{innerhalb}} = \frac{\frac{1}{k-1}\sum_{i} n_i(\bar{x}_i - \bar{x})^2}{\frac{1}{n-k}\sum_{ij}(x_{ij} - \bar{x}_i)^2} \qquad \text{mit } FG = (k-1),(n-k)$$

Wenn $\hat{F} > F_{(k-1),(n-k),\alpha}$, ist mindestens ein Mittelwert von den anderen verschieden, d.h. zwischen mindestens einem Mittelwert und den anderen der Stichprobengruppen besteht ein signifikanter Unterschied.

Führt die Varianzanalyse zu einem signifikanten Befund, muß festgestellt werden, welcher oder welche Mittelwerte signifikant von den anderen abweichen. Dies ist möglich durch die Bildung homogener Gruppen anhand des modifizierten LSD-Tests.

Die k Mittelwerte aus den k Stichprobengruppen werden der Größe nach absteigend geordnet ($\bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \ldots$). Zwischen den benachbarten Mittelwerten wird die Differenz Δ gebildet. Geprüft wird, ob benachbarte Mittelwerte eine größere Differenz Δ aufweisen, als die kleinste signifikante Differenz (least significant difference = LSD). Die Prüfgröße für den LSD-Test lautet:

$$LSD = \sqrt{\frac{2}{n_i} \cdot s^2_{innerhalb} \cdot F_{(1,(n-k),\alpha)}}$$ bei Stichproben gleichen Umfanges

$$LSD = \sqrt{s^2_{innerhalb} \cdot \left(\frac{n_a + n_b}{n_a \; n_b}\right) \cdot F_{(1,(n-k),\alpha)}}$$ bei Stichproben ungleichen Umfanges

Zwischen benachbarten Mittelwerten besteht kein signifikanter Unterschied, wenn $\Delta \leqq LSD$. Es besteht ein signifikanter Unterschied, wenn $\Delta \geqq LSD$.

Liegen die Mittelwerte zu dicht zusammen, bringt der LSD-Test keine Lösung, da die Differenzen zwischen den benachbarten Mittelwerten zu gering sind, zwischen höchstem und niedrigstem Mittelwert aber durchaus ein Unterschied bestehen kann. Es ist daher bei Vorliegen eines solchen Falles notwendig, eine andere Methode anzuwenden: die Beurteilung linearer Kontraste nach Scheffé. Danach besteht zwischen den Mittelwerten ein Unterschied, wenn

$$\frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s_{\bar{x}_A - \bar{x}_B}} > \sqrt{(k-1) \cdot F_{[(k-1),(n-k),\alpha)]}}$$

wobei $s_{\bar{x}_A - \bar{x}_B} = \sqrt{s^2_{innerhalb} \sum_{i=1}^{k} \frac{c_i^2}{n_i}}$

Dabei können Gruppen von Mittelwerten verglichen werden, aber auch ein Mittelwert mit einer Gruppe von Mittelwerten oder zwei Mittelwerte miteinander.
Dazu ein Beispiel:

a. $\bar{x}_A = \bar{x}_1+\bar{x}_2+\bar{x}_3 \quad \bar{x}_B = \bar{x}_4+\bar{x}_5$

b. $\bar{x}_A = \bar{x}_1 \quad \bar{x}_B = \bar{x}_2+\bar{x}_3+\bar{x}_4+\bar{x}_5$

c. $\bar{x}_A = \bar{x}_2 \quad \bar{x}_B = \bar{x}_5$

Vergleiche dieser Art werden, als lineare Kontraste bezeichnet, wie folgt geschrieben:

a. $\frac{1}{3}(\bar{x}_1+\bar{x}_2+\bar{x}_3) - \frac{1}{2}(\bar{x}_4+\bar{x}_5)$

b. $\bar{x}_1 - \frac{1}{4}(\bar{x}_2+\bar{x}_3+\bar{x}_4+\bar{x}_5)$

c. $\bar{x}_2 - \bar{x}_5$

Sie sind die lineare Funktion der k Mittelwerte $\bar{x}_i$, die durch k bekannte Konstanten c_i, die die Bedingung

$$\sum_{i}^{k} c_i = 0$$

erfüllen, festgelegt sind. Diese Konstanten sind für

a. $c_1=c_2=c_3= +\frac{1}{3} \quad c_4=c_5= -\frac{1}{2} \quad \frac{1}{3}+\frac{1}{3}+\frac{1}{3}-\frac{1}{2}-\frac{1}{2} = 0$

b. $c_1= +1 \quad c_2=c_3=c_4=c_5= -\frac{1}{4} \quad 1-\frac{1}{4}-\frac{1}{4}-\frac{1}{4}-\frac{1}{4} = 0$

c. $c_2= +1 \quad c_5= -1 \quad 1-1 = 0$

Bei Gruppen mit ungleichen Stichprobenumfängen geht man zu gewichteten linearen Kontrasten über. So z.B. für a.:

$$\bar{x}_A-\bar{x}_B = \frac{n_1\bar{x}_1 + n_2\bar{x}_2 + n_3\bar{x}_3}{n_1+n_2+n_3} - \frac{n_4\bar{x}_4 + n_5\bar{x}_5}{n_4+n_5}$$

$$s_{\bar{x}_A-\bar{x}_B} = \sqrt{s^2_{\text{innerhalb}} \sum_{i}^{k} c_i \left(\frac{1}{n_i}\right)}$$

$$= \sqrt{s^2_{\text{innerhalb}} \left[\left(\frac{n_1}{n_1+n_2+n_3}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_1} + \left(\frac{n_2}{n_1+n_2+n_3}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_2} + \right.}$$

$$\left. + \left(\frac{n_3}{n_1+n_2+n_3}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_3} + \left(\frac{n_4}{n_4+n_5}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_4} + \left(\frac{n_5}{n_4+n_5}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_5}\right]$$

3.3. Regressions- und Korrelationsanalyse

Regressions- und Korrelationsrechnungen sind Methoden zur Aufdeckung und Beschreibung der Abhängigkeiten von zwei und mehr Merkmalen. Während sich die Regressionsanalyse mit der Art des Zusammenhanges der Merkmale beschäftigt, ist es die Korrelationsanalyse, die den Grad des Zusammenhanges zwischen den Merkmalen bestimmt. Hier soll nur kurz auf den Fall eines linearen Zusammenhanges von zwei Merkmalen (Zufallsgrößen X und Y) eingegangen werden.

Der Zusammenhang der Zufallsgrößen X und Y wird durch die Regressionsgerade dargestellt. Die Variable x ist die unabhängige, y die abhängige Variable. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$y = a + bx \qquad \text{wobei} \quad a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2}$$

$\bar{y}$ = Mittelwert der y_i

$\bar{x}$ = Mittelwert der x_i

siehe dazu auch Abschnitt 2.3.

Die Größe b wird als Regressionskoeffizient bezeichnet. Er gibt die Steigung der Geraden an und ist ein Maß für die Änderung von y wenn x sich um eine Einheit verändert.

Der Korrelationskoeffizient (r) gibt den Grad des Zusammenhanges zwischen den beiden Merkmalen an. Er ist unabhängig von der Einheit der Merkmale und kann alle Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Ist $r = \pm 1$, so besteht ein direkter linearer Zusammenhang, ist $r = 0$, so liegt keine Abhängigkeit zwischen den beiden Merkmalen vor. Die Berechnungsformel für den Korrelationskoeffizienten lautet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i-x)^2 \cdot \sum_{i=1}^{n}(y_i-y)^2}}$$

Zum Nachweis einer Abhängigkeit zwischen zwei Variablen muß festgestellt werden, ob der Korrelationskoeffizient signifikant von 0 verschieden ist. Dies kann mit Hilfe eines Tests erfolgen, der auf der t-Verteilung beruht:

$$\pm t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{n - 2} \qquad FG = n - 2$$

Ist der errechnete Wert für t größer als der Tabellenwert, so ist r signifikant von 0 verschieden, es besteht mit einer statistischen Sicherheit S eine Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen. Ist der errechnete Wert kleiner als der Tabellenwert, so liegt keine Abhängigkeit vor. Der Test ist einseitig.

Oft ist es auch wichtig, den Vertrauensbereich der Regressionsgeraden festzustellen, um entscheiden zu können, ob bestimmte Werte noch in die Beziehung passen oder nicht. Dazu muß das Vertrauensintervall von a und b errechnet werden.

Das Vertrauensintervall für a:

$a - t_{\alpha/2} \cdot s_a \leq \alpha \leq a + t_{\alpha/2} \cdot s_a$ — a = Schätzwert für α aus der Stichprobe

$$s_a = \sqrt{\frac{s^2 \sum_{i=1}^{n} x_i^2}{n \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}}$$ — s_a = Standardfehler von a

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - a - bx_i)^2}{n - 2}$$ — $\frac{a - \alpha}{s_a}$ ist verteilt nach $t_{(n-2)}$

Das Vertrauensintervall für b:

$b - t_{\alpha/2} \cdot s_b \leq \beta \leq b + t_{\alpha/2} \cdot s_b$ — b = Schätzwert für β aus der Stichprobe

$$s_b = \sqrt{\frac{s^2}{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}}$$ — s_b = Standardfehler von b

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - a - bx_i)^2}{n - 2}$$ — $\frac{b - \beta}{s_b}$ ist verteilt nach $t_{(n-2)}$

Das Vertrauensintervall der geschätzten y_i:

$$y_i - t_{\alpha/2}\, s \cdot K_i \leq Y_i \leq y_i + t_{\alpha/2}\, s \cdot K_i \qquad FG = n-2$$

y_i = Schätzwert für Y_i aus der Stichprobe

$$K_o = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - 2x_o \sum_{i=1}^{n} x_i + n x_o^2}{n \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - a - bx_i)^2}{n - 2}}$$

Die einzelnen Punkte zur Ermittlung der Vertrauensgrenzen der Regressionsgeraden lassen sich am besten in Form einer Tabelle zusammenstellen, in der aufgeführt werden:

x_i	y_i	K_i	$K_i \cdot s \cdot t_{\alpha/2}$	Vertrauensgrenzen für y_i untere	obere

4. Samenmaterial

Die Untersuchung befaßt sich mit Samen von Pisum sativum L., Sorte "Dippes gelbe Viktoria", sowie Samen ihrer strahleninduzierten Mutanten 46C, 68C, 176A, 251, 489C und 1201A. Die Mutanten weichen in bestimmten Merkmalen (siehe Tabelle 4) von der Ausgangsform (NF) ab. Weiter wurden die Rekombinanten $R18_{37}$, $R18_{52}$, R20D (46Cx489C); R78, $R96_{61}$, $R98_{81}$ (176Ax489C); R163, R177 Typ B, R224 (1201Ax489C) und R312 (46Cx68C), R328 (176Ax68C), R354 (1201Ax68C) untersucht. Bestimmt wurden der Rohprotein- Methionin- und Lysingehalt der Samen.
Die Indizes bei den Rekombinanten-Nummern bedeuten gleiche Rekombinanten unterschiedlicher Stengellänge.

Die Mutanten 68C, 176A, 251 und 1201A sind Ein-Gen-Mutanten, d.h. die morphologisch sichtbaren Unterschiede beruhen auf der Veränderung eines Gens.
Mutante 46C ist für zwei Gene rezessiv. Neben der Frühreife tritt bei ihr zusätzlich Stengelgabelung auf. Diese ist auf ein zweites mutiertes Gen zurückzuführen, das wahrscheinlich in Verbindung mit einer Fremdbefruchtung aus dem Genom der Mutante 1201A bezogen worden ist. Da dieses Gen eine starke Penetranzabschwächung zeigt, kommt die Gabelung nur bei einem Teil der Pflanzen zur Ausbildung. Mutante 46C ist demnach eigentlich eine Rekombinante aus 46Ax1201A. Der Einfachheit halber und da sie im Sortiment als solche geführt wird, soll sie im folgenden weiter als Mutante 46C bezeichnet werden (GOTTSCHALK 1972a).
Mutante 489C ist nicht, wie zunächst angenommen, in einem Gen mit starker Penetranz mutiert, sondern in acht bis zehn Genen, von denen sich nur drei manifestieren. Sie kommen erst bei Kreuzungen zur Ausprägung (GOTTSCHALK 1972a), die eine Vielzahl unterschiedlicher komplizierter Spaltungen ergeben, die auf die genetische Konstitution der Mutante 489C zurückzuführen sind. Bei den Rekombinanten findet sich das Phänomen der Verbänderung in seiner typischen Gestaltung wie auch in aufgelockerter Form und kann kombiniert sein mit Schmalblättrig-

Tabelle 4: Charakteristik der untersuchten Genotypen

Von der Ausgangsform abweichende morphologische und physiologische Merkmale

Genotyp	von der Ausgangsform abweichende Merkmale
46C	Frühblüher, 1. Blüte am 5. Nodus, gut fertil, abweichende Gestaltung der Korolle, gegabelter Stengel [1) 3)]
68C	Anzahl der Samenanlagen im Fruchtknoten erhöht [1)]
176A	reduzierte Größe der Blüten, Blätter, Hülsen und Samen, schmale Fiedern und Nebenblätter [1) 2)]
251	Stengel locker verbändert [1) 5)]
1201A	dichotome Stengelgabelung (unvollständige Penetranz), Anzahl der Blüten und Hülsen vermehrt [1) 4)]
489C	oberes Stengelende stark verbändert, Anzahl der Blüten und Hülsen vermehrt, um 10 Tage verspäteter Blühbeginn [1) 3)]
$R18_{37}$	extrem gestaucht, tiefe Hülsen, verbändert, gegabelt (mit Penetranzabschwächung) [5)] 489Cx46C
$R18_{52}$	schwach gestaucht, tiefe Hülsen, verbändert und gegabelt, spät blühend [5)] 489Cx46C
R20D	Stengelgabelung sehr tief am Stengel, Verbänderung, kleine Samen, Spätblüher, hohe Pflanze, zerbrechliche wenig vitale Pflanze; für den feldmäßigen Anbau nicht geeignet [3)] 489Cx46C
R78	gestaucht, locker verbändert, gegabelt (mit Penetranzabschwächung [5)] 489Cx176A

Fortsetzung Seite 43

Tabelle 4: Charakteristik der untersuchten Genotypen

Fortsetzung

Genotyp	von der Ausgangsform abweichende Merkmale
$R98_{61}$	extrem gestaucht, spät blühend, gegabelt (mit Penetranzabschwächung) [5] 489Cx176A
$R98_{81}$	gestaucht, spät blühend, gegabelt (mit Penetranzabschwächung) [5] 489Cx176A
R163	schwach gestaucht, locker verbändert, gegabelt (mit Penetranzabschwächung) [5] 489Cx1201A
R177 Typ B	morphologisch identisch mit Mutante 1201A aber Penetranz stabilisiert [3)5] 489Cx1201A
R224	locker verbändert [3)5] 489Cx1201A
R312	hohe Anzahl von Samenanlagen im Fruchtknoten, früher Blühbeginn [5) 6] 68Cx46C
R328	hohe Anzahl von Samenanlagen im Fruchtknoten, Schmalblättrigkeit [5) 6] 68Cx176A
R354	hohe Anzahl von Samenanlagen im Fruchtknoten, Stengelgabelung (mit Penetranzabschwächung) [5) 6] 68Cx1201A

Erträge, Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt der Samen der aufgeführten Genotypen sind in den entsprechenden Tabellen im Ergebnisteil verzeichnet.

Fortsetzung Seite 44

Tabelle 4: Charakteristik der untersuchten Genotypen

Fortsetzung

Genotyp	von der Ausgangsform abweichende Merkmale
1) GOTTSCHALK 1964	
2) GOTTSCHALK und MÜLLER 1970	
3) GOTTSCHALK 1972 a	
4) GOTTSCHALK 1972 b	
5) GOTTSCHALK unveröffentlicht	
6) Mutante 68C wurde mit den anderen Genotypen gekreuzt, um in die Genome dieser das Merkmal"Erhöhung der Samenzahl pro Pflanze" einzubauen 4)	

keit, Früh- oder Spätreife sowie mit verschiedenen Stengellängen. Das gleiche gilt auch für unverbänderte wie für gegabelte Rekombinanten. Aus dieser Vielfalt der Rekombinanten wurden für die Untersuchung solche ausgewählt, die einen besonders hohen Ertrag (=Samenproduktion pro Pflanze) aufweisen.

Das bearbeitete Samenmaterial stammt von homozygoten Genotypen. Die für die Untersuchung benötigten Pflanzen wurden auf dem Versuchsfeld, Landgrabenweg, angebaut. Die auf den Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt analysierten Samen stammen sämtlich aus der Ernte 1971. Der Boden des Versuchsfeldes Landgrabenweg besteht aus Parabraunerde mittlerer bis hoher Basensättigung, die aus kalkhaltigem Flutlehm des Rheins entstanden ist. Der feinsandige Lehm besitzt gute physikalische Eigenschaften, d.h. er ist gut durchlüftet und besitzt eine hohe Wasserkapazität, ohne das Wasser aufzustauen. Die Reaktion des nährstoffreichen Bodens ist etwa neutral. Der Standort wird schon seit vielen Jahren zur Pflanzenzüchtung genutzt (HIEMKE 1973).

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse sollen im folgenden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten geordnet dargestellt werden mit dem Ziel, die möglichen Interpretations- und Bezugsmöglichkeiten darzustellen. Betrachtet werden die Ergebnisse unter den folgenden Aspekten: Trockengewicht, Rohproteingehalt, Methioningehalt, Lysingehalt der Samen, Methionin- und Lysinanteil am Rohprotein, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen in Bezug auf die Pflanze. Alle Ergebnisse beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf Trockengewichte.

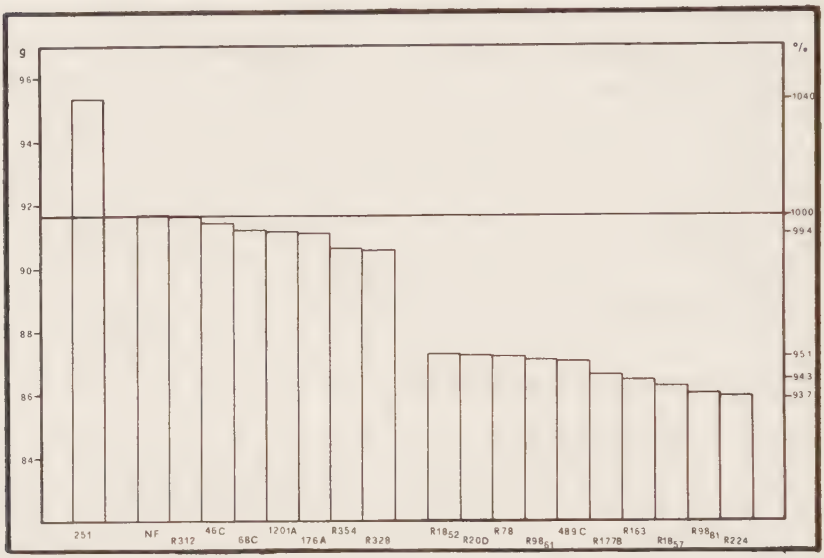
5.1. Trockengewicht der Samen

Die Trockengewichtsbestimmung der Samen wurde vorgenommen, da das Trockengewicht eine konstantere Größe ist als das Frischgewicht und genauer als die Werte für luftgetrocknete Samen. Um den Wassergehalt bzw. das Trockengewicht der Samen der einzelnen Genotypen zu ermitteln, wurden jeweils 1 g Samenmehl 8 Tage bei 105°C im Trockenschrank getrocknet. Abbildung 1 stellt das Trockengewicht in g pro 100 g Samenmehl für die untersuchten Genotypen dar. Mutanten und Rekombinanten sind nach steigendem Wassergehalt der Samen geordnet.

Es zeigt sich, daß die Samen der Mutante 251 im Vergleich zu den anderen einen extrem niedrigen Wassergehalt aufweisen. Mutante 4890 hat ein wesentlich geringeres Trockengewicht. Die Samen der anderen Mutanten liegen mit dem Trockengewicht der Samen in Höhe der Ausgangsform.

Die Samen der Rekombinanten aus Kreuzungen mit Mutante 4890 weisen ebenfalls einen hohen Wassergehalt auf, während für die anderen Rekombinanten Werte festgestellt wurden, die wie die der Eltern im Bereich der Ausgangsform liegen.

Abbildung 1: Trockengewicht der untersuchten Samen in g pro 100 g Samenmehl und in % der Ausgangsform



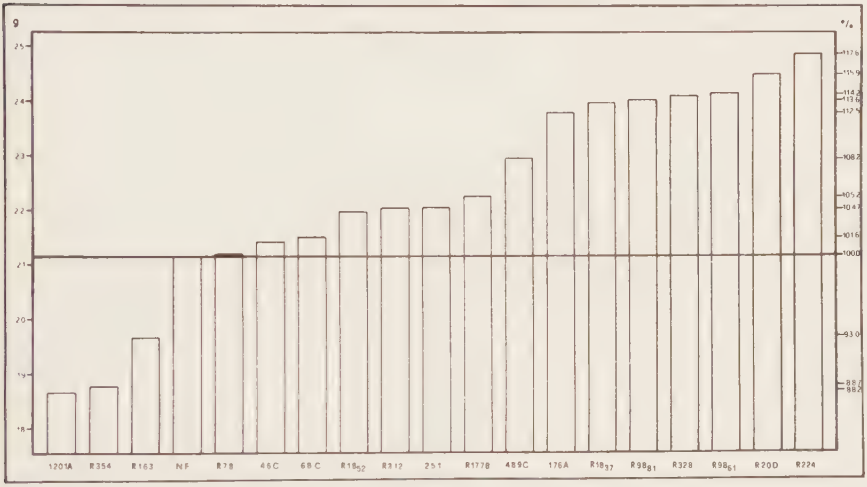
5.2. Rohproteingehalt der Samen

Zur Ermittlung des Rohproteingehaltes der Samen wurde auf die Kjeldahl-Methode zurückgegriffen (KEIL und ŠORMOVA 1965). Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß mit diesem Verfahren der Rohproteingehalt (oder auch Gesamtproteingehalt) ermittelt wird, d.h. der tatsächliche oder Reinproteingehalt liegt etwas niedriger (HIEMKE 1973, WOLFF 1973), da in die Berechnung auch der Nicht-Proteinstickstoff mit eingeht.

Die Rohproteinbestimmung erfolgte an frischen Samen, die erhaltenen Werte wurden dann auf die Trockengewichte umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt, die Ge-

notypen sind nach steigendem Rohproteingehalt geordnet.

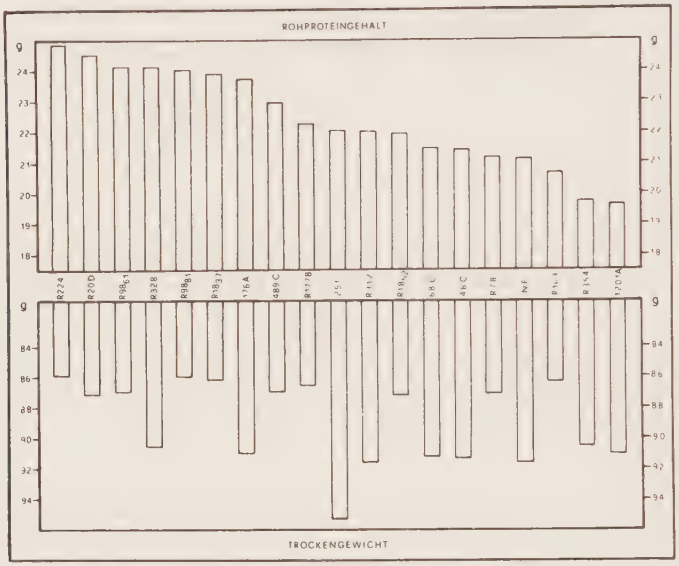
Abbildung 2: Rohproteingehalt der untersuchten Samen in g pro 100 g Samenmehl und in % der Ausgangsform



Wie aus Abbildung 3 deutlich wird, stehen Trockengewicht und Rohproteingehalt der Samen in keinem Zusammenhang.

Betrachtet man Abbildung 2, scheinen drei Gruppen von Genotypen vorzuliegen: solche, deren Samen einen niedrigeren Rohproteingehalt aufweisen als die Ausgagngsform (NF), solche, die den gleichen Rohproteingehalt haben wie die NF und solche mit einem höheren Rohproteingehalt der Samen als die Ausgangsform. Um dies genau zu untersuchen, wurde eine Varianzanalyse vorgenommen. Dabei ergab sich, daß in der Tat zwischen den Mittelwerten für den Rohproteingehalt einzelner Genotypen ein signifikanter Unterschied besteht ($\hat{F} = 53{,}648^{+++}$; $F_{(18;38;0{,}001)} = 3{,}642$). Mit Hilfe des LSD-Tests und zur Absicherung auch durch den Scheffé-Test, wurden die in Abbildung 4 dargestellten Gruppen von Genotypen mit gleichem Rohproteingehalt der Samen pro 100 g Samenmehl ermittelt.

Abbildung 3: Rohproteingehalt und Trockengewicht der untersuchten Samen in g pro 100 g Samenmehl



Danach liegen die Mutanten 251, 68C und 46C mit dem Rohproteingehalt der Samen im Bereich der Ausgangsform. Mutante 176A liegt wesentlich höher, während Mutante 1201A einen geringeren Samenrohproteingehalt aufweist als die NF. Mutante 488C liegt etwas höher als die Ausgangsform.

Die Rekombinanten haben wie die Mutanten der NF gegenüber einen gleichen, höheren oder niedrigeren Rohproteingehalt der Samen. In den Abbildungen 5 bis 8 soll das Ergebnis, das durch den LSD- und den Scheffé-Test erhalten wurde, auf den Vergleich Eltern - Rekombinanten angewandt werden.
Abbildung 5 zeigt die Eltern und Rekombinanten der Kreuzung 488Cx46C. Die Rekombinanten R20D und R18$_{37}$ haben im Vergleich zu den beiden Eltern einen erhöhten Rohproteingehalt, während Rekombinante R18$_{52}$ im gleichen Bereich liegt wie der Elter 46C.

Abbildung 4: Gruppen von Genotypen mit gleichem Rohproteingehalt der Samen pro 100 g Samenmehl

5 % Vertrauensgrenzen

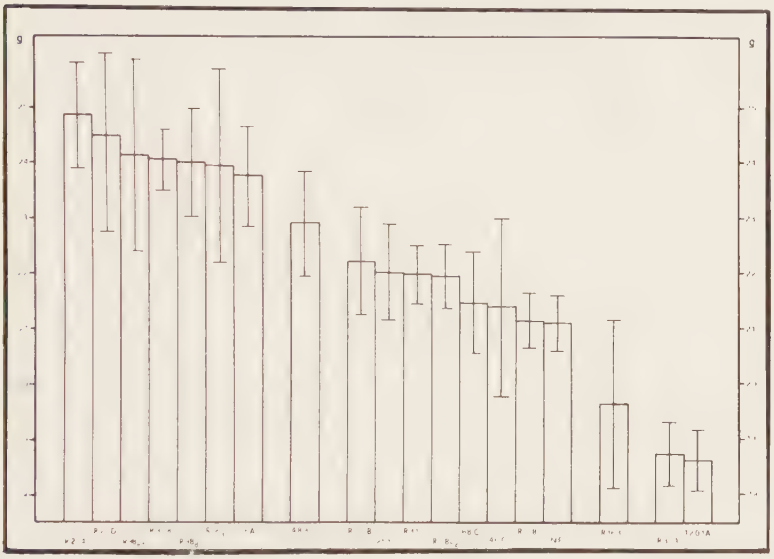


Abbildung 6 zeigt die Verhältnisse bei der Kreuzung 489Cx176A: die Rekombinanten $R98_{61}$ und $R98_{81}$ liegen mit ihrem Rohproteingehalt der Samen im gleichen Bereich wie der Elter 176A, also dem mit dem höheren Rohproteingehalt pro 100 g Samenmehl. R78, die dritte Rekombinante dieser Kreuzung, liegt mit dem Samenrohproteingehalt im Bereich der Ausgangsform, also niedriger als beide Eltern.

Aus Abbildung 7 wird deutlich, wie der Rohproteingehalt bei den Samen der Rekombinanten der Kreuzung 489Cx1201A liegt. Rekombinante R224 zeigt einen beiden Eltern gegenüber erhöhten Wert für den Rohproteingehalt während die Rekombinanten R163 und R177 Typ B einen zwischen den Eltern liegenden Wert aufweisen. Mutante 1201A ist die Mutante, deren Rohproteingehalt geringer ist als der der Ausgangsform.

Abbildung 5: Vergleich des Rohproteingehaltes der Samen von
Abbildung 6: Eltern und Rekombinanten (pro 100 g Samenmehl)

Abb. 5:

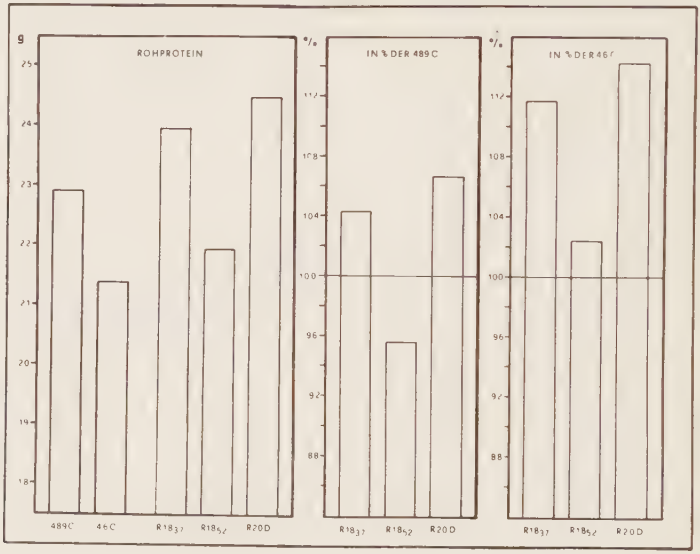


Abb. 6:

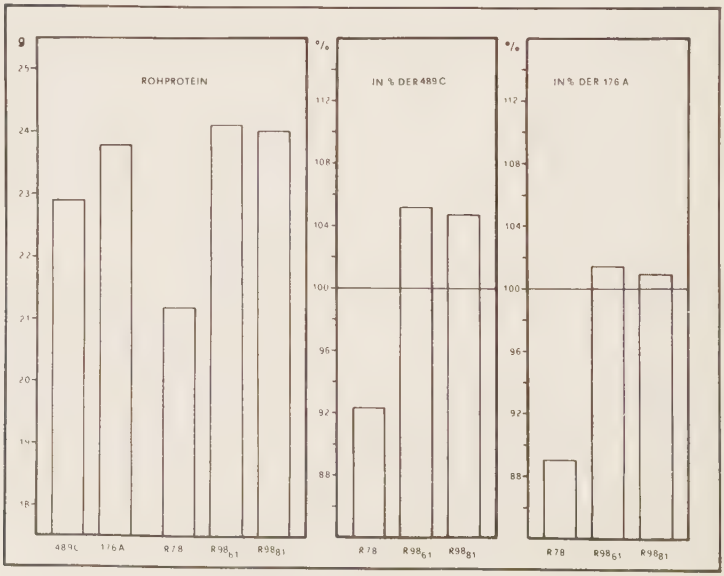


Abbildung 7: Vergleich des Rohproteingehaltes der Samen von
Abbildung 8: Eltern und Rekombinanten (pro 100 g Samenmehl)

Abb. 7:

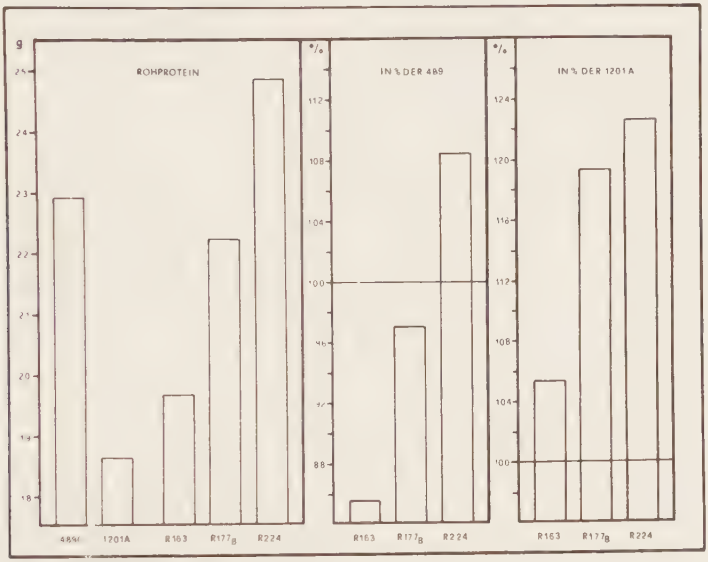


Abb. 8:

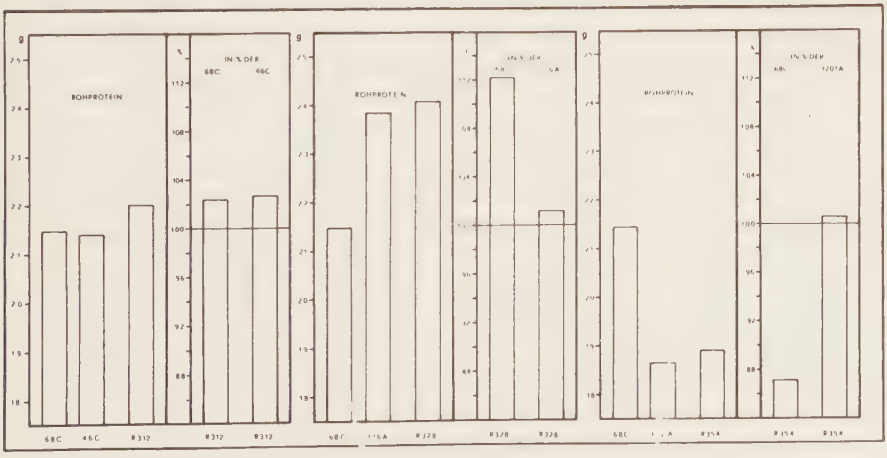


Abbildung 8 zeigt Kreuzungen mit Mutante 68C: die Rekombinante R312 (68Cx46C) hat den gleichen Rohproteingehalt wie ihre Eltern. Rekombinante R354 (68Cx1201A) liegt in Höhe des Elters 1201A, also der Mutante mit dem niedrigeren Rohproteingehalt der Samen, während Rekombinante R328 (68Cx176A) den gleichen Gehalt an Rohprotein aufweist wie der Elter 176A, das ist der Elter mit dem höheren Samenrohproteingehalt.

Damit sind alle Möglichkeiten - gleicher, höherer, niedrigerer und zwischen den Eltern liegender Rohproteingehalt der Samen - aufgetreten. Es scheinen also genetisch bedingte Unterschiede im Rohproteingehalt der Samen der verschiedenen hier untersuchten Genotypen zu bestehen, auf die in der Diskussion näher eingegangen werden wird.

5.3. Methioningehalt der Samen

Der Methioningehalt der untersuchten Samen wurde mit Hilfe der mikrobiologischen Methode (siehe Abschnitt 2) an Frischgewichten bestimmt und auf Trockengewichte umgerechnet. Die Ergebnisse der Methioninbestimmung an Frischgewichten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Tabelle 6 enthält die auf 100 mg Samenmehl Trockengewicht umgerechneten Ergebnisse sowie Angaben über Trockengewicht, Rohproteingehalt und Methioninanteil am Rohprotein für die einzelnen untersuchten Genotypen.

Es stellt sich die Frage, ob alle Genotypen einen unterschiedlichen Gehalt an Methionin aufweisen oder ob auch hier, ähnlich wie beim Rohproteingehalt der Samen, Gruppen von Genotypen den gleichen Gehalt an Methionin pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht haben. Es wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, die einen signifikanten Befund lieferte ($\hat{F} = 73{,}33^{+++}$; $F_{(17;66;0{,}001)} = 3{,}32$). LSD-Test und der Test nach Scheffé ergaben dann die Gruppenbildung, die in Abbildung 9 dargestellt ist.

Tabelle 5: Methioningehalt der untersuchten Genotypen in µg pro 100 mg Samenmehl

Frischgewicht

Genotyp	Extremwerte	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeff. in %
NF	96,438 - 102,625	98,583	2,701	2,73982
46C	114,429 - 120,875	118,345	2,537	2,14373
68C	116,700 - 119,700	118,389	1,542	1,29733
176A	120,500 - 126,313	124,115	2,147	1,72985
251	150,406 - 158,813	153,757	3,405	2,21453
489C	135,506 - 150,838	143,826	6,737	4,68413
1201A	107,500 - 112,048	110,447	2,258	2,04419
R 18_{37}	134,325 - 144,463	139,583	5,891	4,22043
R 18_{52}	148,838 - 148,838	148,838	0,000	0,00000
R 20D	145,050 - 149,233	147,304	1,764	1,19752
R 78	127,038 - 132,738	129,474	2,470	1,90772
R 98_{61}	143,544 - 153,683	149,569	5,192	3,47131
R 98_{81}	150,338 - 154,069	151,690	2,067	1,36265
R163	122,450 - 127,750	125,294	2,954	2,35765
R177 TypB	128,331 - 147,320	138,263	10,895	7,87848
R224	131,863 - 134,875	133,288	1,513	1,13514
R312	117,500 - 119,700	118,655	1,104	0,93040
R328	112,400 - 125,400	124,110	1,740	0,40190
R354	118,833 - 118,760	118,525	0,221	0,18646

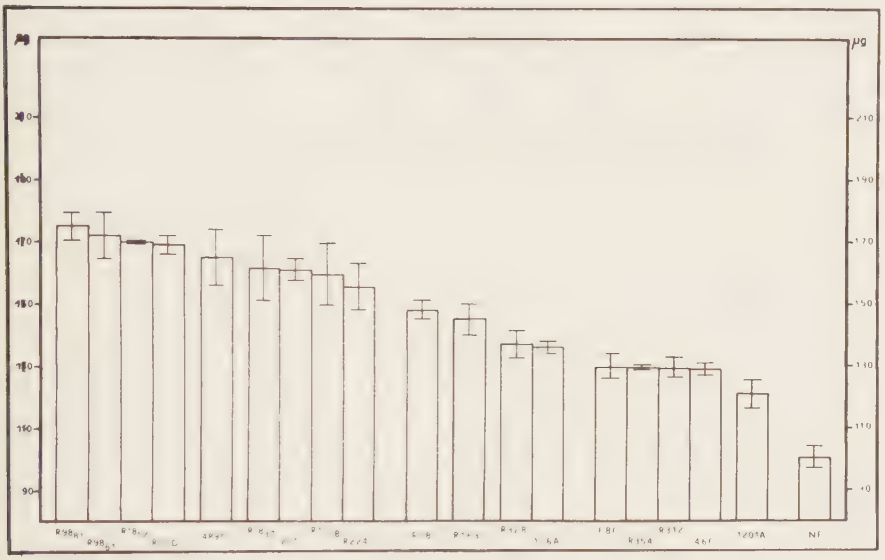
Tabelle 6: Wassergehalt, Rohproteingehalt, Methioningehalt und Methioninanteil am Rohprotein der untersuchten Samen

Genotyp	Wasser-gehalt 1)	Rohprotein-gehalt 2)	Methionin-gehalt 3)	Methionin % 4)
NF	8,32	21,13	107,529	0,51
46C	8,56	21,41	129,289	0,60
68C	8,80	21,47	129,812	0,60
176A	8,89	23,77	136,225	0,57
251	4,65	22,02	161,255	0,73
489C	13,00	22,93	165,126	0,72
1201A	8,84	18,63	121,160	0,65
R 18_{37}	13,75	23,94	161,546	0,68
R 18_{52}	12,75	21,95	170,588	0,78
R 20D	12,80	24,48	168,902	0,69
R 78	12,80	21,16	148,288	0,70
R 98_{61}	12,95	24,12	172,404	0,71
R 98_{81}	14,00	24,01	175,000	0,73
R163	13,55	19,64	144,932	0,74
R177 Typ B	13,42	22,23	159,693	0,72
R224	14,10	24,85	155,166	0,62
R312	8,35	21,99	129,466	0,59
R328	9,43	24,07	137,032	0,57
R354	9,37	18,74	129,676	0,69

1) mg / 100 mg Samenmehl Frischgewicht
2) mg / 100 mg Samenmehl Trockengewicht
3) µg / 100 mg Samenmehl Trockengewicht
4) % Methioninanteil am Rohprotein

Abbildung 9: Gruppen von Genotypen mit gleichem Methioningehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl

5 % Vertrauensgrenzen



Aus Abbildung 9 ist zu ersehen, daß Mutante 489C in Bezug auf den Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl eine Gruppe für sich darstellt. Ein Teil der Rekombinanten, deren einer Elter Mutante 489C ist, liegt mit dem Methioningehalt über, der andere Teil unterhalb des Wertes, der für Mutante 489C festgestellt wurde.

Die höchsten Methioningehalte weisen die Samen der Rekombinanten $R98_{\varepsilon 1}$ und $R98_{61}$ auf, deren Elter Mutante 176A nach Mutante 489C den zweithöchsten Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht verglichen mit den Samen der andren Mutanten (mit Ausnahme von Mutante 251) aufweist. Rekombinante R78, die dritte dieser Kreuzung 489Cx176A hat einen Methioningehalt, der zwischen dem für die beiden Eltern festgestellten Wert liegt.

Rekombinante $R18_{52}$ und R20D (beide 489Cx46C) liegen in Bezug auf den Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl über dem Wert des Elters 489C, Mutante 46C hat den dritthöchsten Methioningehalt. Rekombinante $R18_{37}$, ebenfalls 489Cx46C, liegt mit dem Methioningehalt zwischen den beiden Eltern und damit in der gleichen Gruppe wie die Rekombinanten R177 Typ B und R224 (beide 489Cx1201A), die damit auch zwischen den beiden Eltern liegen. Mutante 1201A hat den niedrigsten Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl innerhalb der untersuchten Mutanten. Rekombinante R163 (489Cx1201A) weist ebenfalls einen Methioningehalt auf, der zwischem dem beider Eltern liegt, aber etwas niedriger als der der anderen beiden Rekombinanten aus dieser Kreuzung.

Rekombinante R328 (68Cx176A) hat den gleichen Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl wie der Elter 176A, der höher liegt als der des Elters 68C.

Den gleichen Methioningehalt wie die beiden Eltern weist Rekombinante R312 (68Cx46C) auf; Eltern und Rekombinante sind in Bezug auf den Methioningehalt einander gleich.

Rekombinante R354 (68Cx1201) liegt mit ihrem Methioningehalt ebenfalls in Höhe des Elters, der den höheren Gehalt an Methionin pro 100 mg Samenmehl hat, in diesem Fall also wie Mutante 68C.

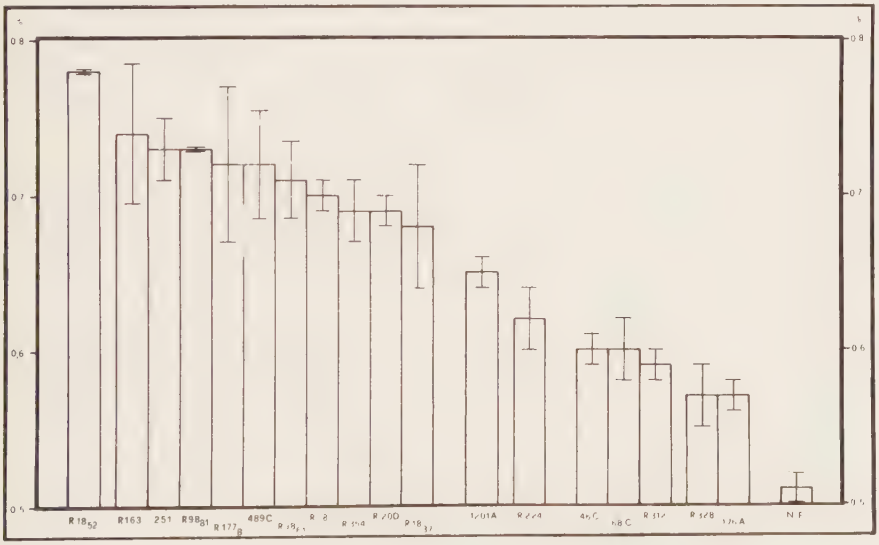
Alle hier untersuchten Mutanten und Rekombinanten haben, bezogen auf den Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht, einen höheren Methioninwert als die Ausgangsform.

Der Methioningehalt bezogen auf gleiche Gewichtsmengen Trockensamenmehl liegt bei den Rekombinanten entweder gleich dem oder höher als der des Elters mit dem höheren Gehalt an dieser Aminosäure oder aber zwischen den Werten der Eltern, nie gleich oder niedriger als der Wert des Elters mit dem geringeren Gehalt an Methionin, wenn man die in dieser Untersuchung analysierten Samen betrachtet.

Da der Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl nicht viel aussagt, der Bezug auf den Rohproteingehalt und damit auf die Proteinzusammensetzung aber wichtig ist, wurden die erhaltenen Werte für den Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl Trokkengewicht auf den Rohproteingehalt pro 100 mg Samenmehl Trokkengewicht bezogen. Nach signifikanter Varianzanalyse ($\hat{F} = 52,28^{+++}$; $F_{(17;66;0,001)} = 3,32$) wurde ebenfalls eine Gruppenbildung mit Hilfe des LSD-Tests vorgenommen und durch den Scheffé-Test kontrolliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

Abbildung 10: Gruppen von Genotypen, deren Rohprotein der Samen den gleichen Methioninanteil aufweist

5 % Vertrauensgrenzen



Den höchsten Methioninanteil am Rohprotein weist Rekombinante $R18_{37}$ (489Cx460) auf, den niedrigsten die Ausgangsform. Auch hier ist also bei allen Mutanten und Rekombinanten eine Erhö-

hung gegenüber der NF zu beobachten.

Die Rekombinanten R78, $R98_{61}$ und $R98_{81}$ (alle 489Cx176A) zeigen den gleichen Methioninanteil am Rohprotein der Samen wie der Elter 489C, haben also einen höheren Methioninanteil als der andere Elter 176A. Das gleiche gilt für die Rekombinanten $R18_{37}$ und R20D (beide 489Cx46C), die dritte Rekombinante dieser Kreuzung liegt mit ihrem Methioninanteil höher als beide Eltern ($R18_{52}$).
Auch die Rekombinanten R177 Typ B und R163 (489Cx1201A) haben den gleichen Methioninanteil am Rohprotein der Samen wie der Elter 489C - also den des Elters mit dem höheren - die dritte Rekombinante dieser Kreuzung, die R224, hat einen Methioninanteil am Rohprotein der Samen der unter dem beider Eltern liegt.
Rekombinante R312 weist den gleichen Methioninanteil auf wie die beiden Eltern Mutante 68C und 46C, während Rekombinante R328 (68Cx176A) gleich dem Elter 176A ist und Rekombinante R354 (68Cx1201A) hat einen höheren Methioninanteil am Samenrohprotein als beide Eltern.

Durch den Scheffé-Test wird der LSD-Test im großen und ganzen bestätigt. Eindeutig ist nur nicht, ob Rekombinante $R18_{52}$ höher oder gleich dem Elter 489C liegt, der Unterschied also zufällig oder signikant ist. Anzunehmen ist, daß beide den gleichen Methioninanteil haben.
Das gleiche gilt für die Mutanten 68C und 176A. Anzunehmen ist auch hier, daß die Differenz nur zufällig ist. Das würde bedeuten, daß Rekombinante R328 den gleichen Methioninanteil hat wie beide Eltern und Rekombinante R224 hätte dann auch nicht einen geringeren Anteil an Methionin als beide Eltern sondern den gleichen wie Mutante 1201A.

Man kann also sagen, daß bei fast allen Kreuzungen die Rekombinanten den gleichen Methioninanteil am Rohprotein aufweisen wie einer der beiden Eltern.

5.4. Lysingehalt der Samen

Der Lysingehalt der untersuchten Samen wurde nach der gleichen Methode bestimmt wie der Methioningehalt (siehe Abschnitt 2). Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Lysingehalt der untersuchten Genotypen in µg pro 100 mg Samenmehl

Frischgewicht

Genotyp	Extremwerte	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeff. in %
NF	1400,102 - 1444,286	1419,332	15,95	1,12
46C	1512,408 - 1580,000	1540,969	27,05	1,76
68C	1561,330 - 1567,110	1564,920	3,87	0,25
176A	1520,884 - 1593,265	1541.191	22,38	1,45
251	1540,884 - 1641,429	1600,731	37,20	2,32
489C	1445,646 - 1572,381	1488,886	56,72	3,81
1201A	1467,918 - 1529,109	1492,557	35,13	2,35
R 18_{37}	1518,776 - 1540,646	1538,782	12,84	0,83
R 18_{52}	1500,068 - 1530,871	1520,431	17,64	1,16
R 20D	1512,048 - 1519,197	1515,054	3,67	0,24
R 78	1464,054 - 1495,170	1472,388	13,48	0,92
R 98_{61}	1433,640 - 1499,422	1471,622	34,05	2,31
R 98_{81}	1558,265 - 1696,122	1641,799	59,99	3,65
R163	1456,497 - 1481,837	1468,463	11,28	0,77
R177 TypB	1465,034 - 1561,463	1484,824	38,22	2,57
R224	1419,558 - 1500,340	1473,005	46,29	3,14
R312	1549,330 - 1577,000	1564,220	13,41	0,86
R328	1503,300 - 1555,070	1532,940	19,36	1,26
R354	1481,700 - 1486,300	1484,780	5,47	0,37

Wie auch für den Methioningehalt der Samen wurden die Ergebnisse auf die Trockengewichte umgerechnet. In Tabelle 8 sind die Daten zusammen mit den Werten für Rohprotein und Trockengewicht aufgeführt.

Tabelle 8: Wassergehalt, Rohproteingehalt, Lysingehalt und Lysinanteil am Rohprotein der untersuchten Samen

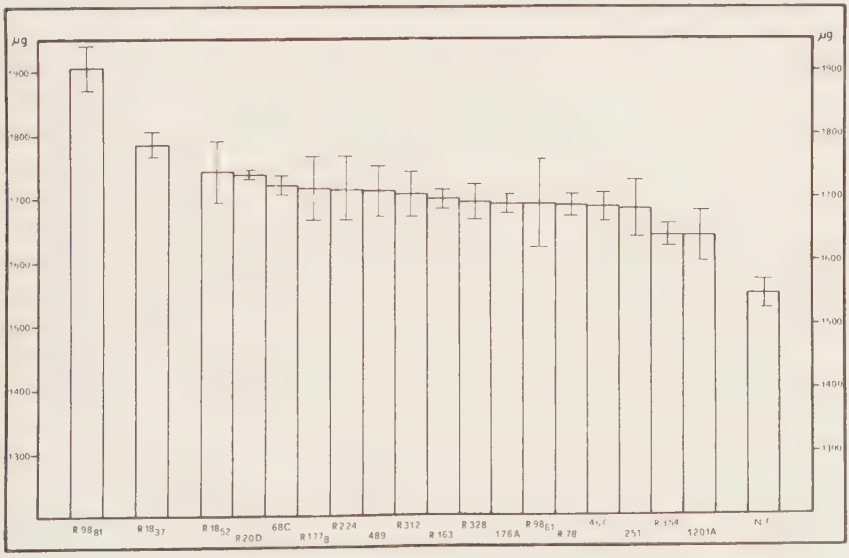
Genotyp	Wasser-gehalt 1)	Rohprotein-gehalt 2)	Lysin-gehalt 3)	Lysin % 4)
NF	8,32	21,13	1548,137	7,32
46C	8,56	21,14	1685,224	7,87
68C	8,80	21,47	1715,923	7,99
176A	8,89	23,77	1691,572	7,12
251	4,65	22,02	1678,795	7,62
489C	13,00	22,93	1711,363	7,46
1201A	8,84	18,63	1637,294	8,79
R 18_{37}	13,75	23,94	1784,095	7,45
R 18_{52}	12,75	21,95	1742,614	7,94
R 20D	12,80	24,48	1737,447	7,10
R 78	12,80	21,16	1688,518	7,98
R 98_{61}	12,95	24,12	1690,548	7,01
R 98_{81}	14,00	24,01	1909,069	7,95
R163	13,55	19,64	1698,569	8,65
R177 Typ B	13,42	22,23	1714,973	7,71
R224	14,10	24,85	1714,790	6,90
R312	8,35	21,99	1706,733	7,76
R328	9,43	24,07	1692,552	7,03
R354	9,37	18,74	1638,297	8,74

1) mg / 100 mg Samenmehl Frischgewicht
2) mg / 100 mg Samenmehl Trockengewicht
3) µg / 100 mg Samenmehl Trockengewicht
4) % Lysinanteil am Rohprotein

Auch hier ergibt sich die Frage, ob zwischen dem Lysingehalt der Samen der einzelnen Genotypen ein Unterschied besteht oder nicht. Das Ergebnis der Varianzanalyse ist signifikant ($\hat{F} = 20,17^{+++}$; $F_{(18;76;0,001)} = 3,32$). Der LSD-Test und auch der Test nach Scheffé ergeben, daß zwischen den einzelnen Werten für die verschiedenen Genotypen kein Unterschied besteht, nur die Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$ sowie die Ausgangsform haben einen signifikant höheren bzw. niedrigeren Gehalt an Lysin pro 100 mg Samenmehl als die übrigen Genotypen. Das bedeutet, daß alle Genotypen bis auf diese drei "Ausreißer" den gleichen Lysingehalt aufweisen; die Unterschiede sind nur zufällig. Abbildung 11 stellt das Ergebnis des LSD-Tests und des Scheffé-Tests dar.

Abbildung 11: Gruppen von Genotypen mit gleichem Lysingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl

5 % Vertrauensgrenzen



Die Ausgangsform (NF) hat den niedrigsten Lysingehalt pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht, bei allen anderen Genotypen bis auf die Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$, ist er in gleichem Umfang erhöht - der Lysingehalt pro 100 mg Samenmehl ist bis auf die beiden Ausreißer bei allen Mutanten und Rekombinanten gleich hoch, in Bezug auf die Ausgangsform in allen Fällen in gleicher Weise erhöht.

Das bedeutet, daß im Lysinanteil am Rohprotein der Samen Unterschiede zwischen den Genotypen bestehen müssen in der gleichen Weise wie auch Unterschiede im Rohproteingehalt zwischen den Genotypen bestehen. Diese Tatsache erklärt auch den im nächsten Abschnitt zu behandelnden Zusammenhang zwischen Rohprotein und Lysinanteil am Rohprotein der Samen (vgl. auch Abschnitt 5.6.).

5.5. Methionin- und Lysingehalt der Samen in Bezug auf den Rohproteingehalt

In Abbildung 12 sind die drei Merkmale Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht für die untersuchten Genotypen dargestellt - geordnet nach steigendem Rohproteingehalt der Samen.

Auch diese Abbildung zeigt, daß der Lysingehalt als konstant angesehen werden kann (siehe Abschnitt 5.4.), während der Methioningehalt der Samen unterschiedlich ist (siehe Abschnitt 5.3.). Zwischen Rohproteingehalt und/oder Methionin- und/oder Lysingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl besteht keine Beziehung.

Zeichnet man jedoch den Rohproteingehalt pro 100 mg Samenmehl und den Lysin- und Methioninanteil am Rohprotein der Samen auf - siehe Abbildung 13 - so zeigt sich, daß zwischen Rohproteingehalt und Lysinanteil am Rohprotein eine Beziehung besteht, der Methioninanteil ist in keinen Zusammenhang mit dem Rohproteingehalt zu bringen. Die Genotypen sind in der Abbildung nach steigendem Rohproteingehalt der Samen angeordnet.

Abbildung 12: Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht

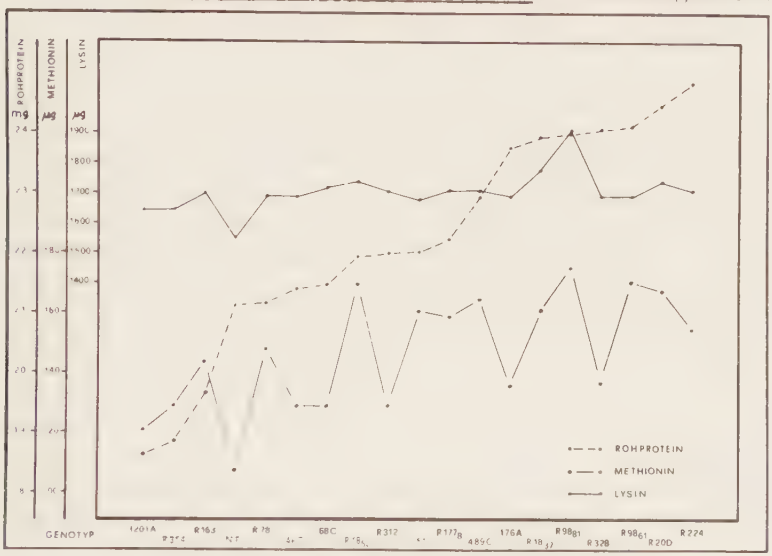
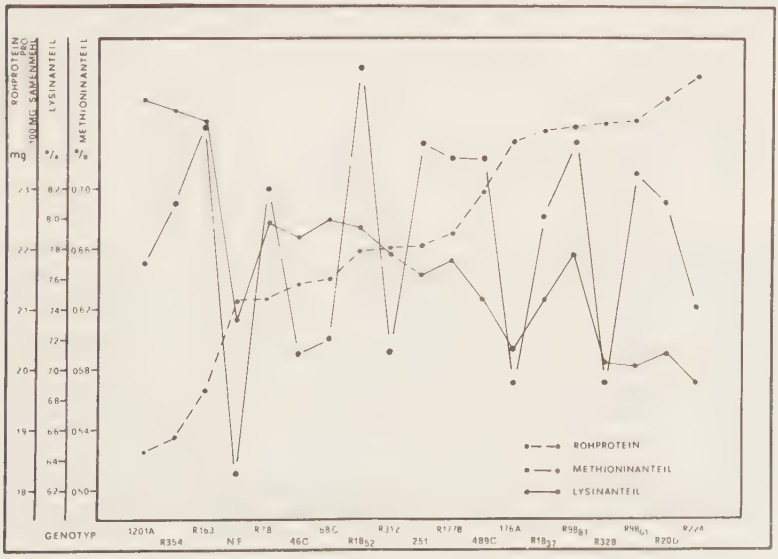
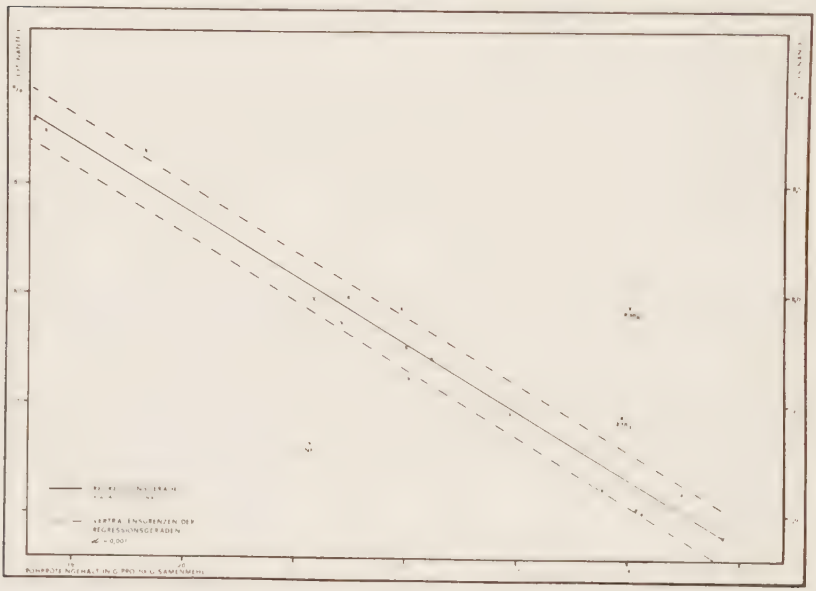


Abbildung 13: Rohproteingehalt und Lysin- bzw. Methioninanteil am Rohprotein der Samen



Mit Hilfe der Regressions- und Korrelationsanalyse wurde festgestellt, ob wirklich eine Beziehung zwischen Rohprotein und Lysinanteil am Rohprotein besteht und wenn, welcher Art sie ist. Abbildung 14 stellt die Beziehung Rohproteingehalt der Samen / Lysinanteil am Samenrohprotein dar.

Abbildung 14: Beziehung zwischen Rohproteingehalt der Samen und Lysinanteil am Samenrohprotein



Die Regressionsrechnung ergab, daß zwischen dem Rohproteingehalt der Samen und dem Lysinanteil am Samenrohprotein eine Beziehung besteht: $r = -0{,}9825$, $t = 20{,}436^{+++}$, d.h. die Korrelation zwischen Rohprotein und dessen Lysinanteil ist hochsignifikant.

Die Erwartungswerte weichen von den tatsächlichen Werten in einer Breite von 0 bis 11,03 % ab. Eine Abweichung von bis zu ± 1,7 % liegt noch im Bereich der Vertrauensgrenzen der Re-

gressionsgeraden. Da bei der mikrobiologischen Methode mit einer Genauigkeit von $\pm 3{,}59$ % bei $\alpha = 0{,}001$ ($\pm 1{,}16$ bei $\alpha = 0{,}05$; $\pm 1{,}92$ bei $\alpha = 0{,}01$) gerechnet werden kann, sollen auch die Werte, die bis zu 3,60 % abweichen noch als zu der Regression zugehörig betrachtet werden. Das bedeutet, daß die Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$ positiv von dieser Korrelation abweichen, die Ausgangsform negativ aus dieser Korrelation herausfällt.

Zu bemerken ist also, daß alle Mutanten und Rekombinanten mit ihrem Lysinanteil am Rohprotein der Samen auf einem höheren Niveau liegen als die Ausgangsform und daß unter den Rekombinanten sich zwei Korrelationsbrecher befinden, die in den positiven Bereich abweichen.

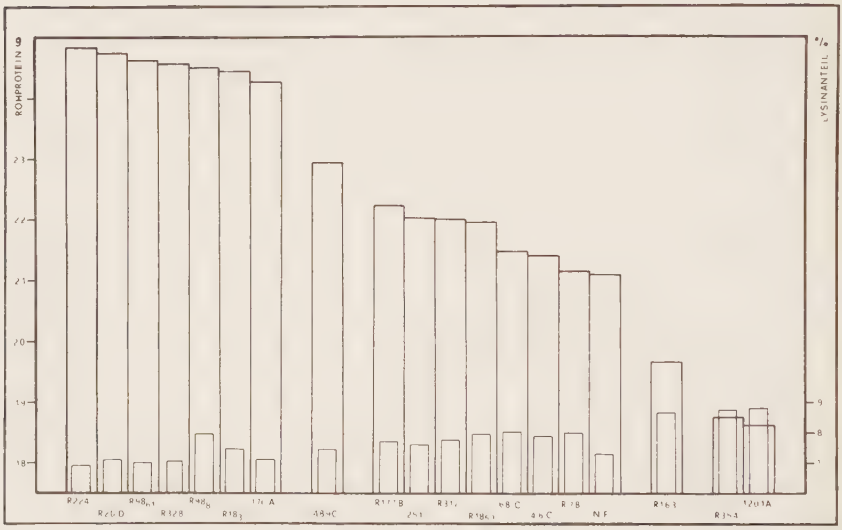
Die Korrelationsbrecher sind von großem Interesse, da sie von der Norm abweichen. Zwar liegen alle Mutanten und Rekombinanten, die hier untersucht wurden, außerhalb des Bereichs der Ausgangsform, aber doch nach einem bestimmten System, aus dem wiederum zwei Rekombinanten ausbrechen. Diese lohnt es sich weiter zu untersuchen, vor allem in diesem Fall, da es sich um positive Abweichungen handelt und Lysin eine essentielle Aminosäure in Bezug auf die menschliche und tierische Ernährung ist. Eine Erhöhung des Lysinanteils am Rohprotein also ernährungsphysiologisch von Bedeutung ist.

5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen

Der Lysingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht ist konstant, d.h. bei allen Genotypen gleich - bis auf die Ausgangsform und zwei Rekombinanten - und damit unabhängig von der Höhe des Rohproteingehaltes der Samen. Werden die Genotypen nach dem Kriterium Lysinanteil am Rohprotein der Samen zu Gruppen von Genotypen mit gleichen Werten hierfür zusammengefaßt, so entspricht diese Gruppenbildung - die Ausreißer ausgenommen - der, die erhalten wurde nach dem Kriterium Rohproteingehalt der Samen pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht. Ab-

bildung 15 zeigt diese Gruppen (vergleiche dazu auch Abbildung 2), die Genotypen sind nach fallendem Rohprotein- bzw. steigendem Lysinanteil am Rohprotein der Samen angeordnet.

Abbildung 15: Gruppen von Genotypen mit gleichem Rohproteingehalt der Samen bzw. gleichem Lysinanteil am Rohprotein



Der unterschiedliche Lysinanteil am Rohprotein ist also bedingt durch den unterschiedlichen Rohproteingehalt der Samen der Genotypen.

Zu klären ist, wie Rohproteingehalt der Samen und Methioningehalt bzw. Methioninanteil am Rohproteingehalt zusammenhängen. Diese Beziehungen sollen in Tabelle 9 verdeutlicht werden.

Es zeigt sich, daß in den meisten Fällen der Methioninanteil des Elters 489C an die Rekombinanten weiter gegeben wird, auch der Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl liegt immer höher als der des anderen, niedriger liegenden Elters, d.h. gleich oder in Richtung des Methioningehaltes der Mutante 489C.

Tabelle 9: Rohprotein-, Methioningehalt und Methioninanteil am Rohprotein der Samen der einzelnen Mutanten und Rekombinanten im Vergleich

Genotyp	Rohprotein mg/100 mg Samenmehl Trockengew.	Methionin µg/100 mg Samenmehl Trockengew.	Methionin in % des Rohproteingehalts
68C	21,47	129,289	0,60
46C	21,41	129,812	0,60
R312	wie beide Eltern	wie beide Eltern	wie beide Eltern
beide Eltern sind gleich, die Rekombinante ist gleich beiden Eltern			
68C	21,47	129,289	0,60
176A	23,77	136,229	0,57
R328	wie Elter 176A	wie Elter 176A	wie Elter 176A
die Rekombinante ist gleich einem Elter, Mutante 176A, das ist der Elter mit dem höheren Rohprotein- und Methioningehalt			
68C	21,47	129,289	0,60
1201A	18,63	121,160	0,65
R354	wie Elter 1201A	wie Elter 68C	höher als beide
die Rekombinante hat den niedrigen Rohproteingehalt des einen Elters und den hohen Methioningehalt des anderen Elters, das ergibt einen beiden Eltern gegenüber erhöhten Methioninanteil am Rohprotein			
489C	22,93	165,126	0,72
46C	21,41	129,812	0,60
$R18_{37}$	höher als beide	zwischen beiden	wie Elter 489C
$R18_{52}$	wie Elter 46C	höher als beide	höher als beide
R20D	höher als beide	höher als beide	wie Elter 489C

Rekombinante $R18_{52}$ hat den gleichen Rohproteingehalt wie Elter 46C, also niedrig, aber eine beiden Eltern gegenüber erhöhten Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl und daher auch einen beiden Eltern gegenüber erhöhten Methioninanteil am Rohprotein; die anderen beiden Rekombinanten dieser Kreuzung weisen unterschiedliche Rohprotein- und Methioningehalte verglichen mit den Eltern auf, aber den gleichen Methioninanteil am Rohprotein wie der Elter 489C

Fortsetzung Seite 68

Tabelle 9: Rohprotein-, Methioningehalt und Methioninanteil am Rohprotein der Samen der einzelnen Mutanten und Rekombinanten im Vergleich Fortsetzung

Genotyp	Rohprotein mg/100 mg Samenmehl Trockengew.	Methionin µg/100 mg Samenmehl Trockengew.	Methionin in % des Rohproteingehalts
489C	22,93	165,126	0,72
176A	23,77	136,229	0,57
R78	weniger als beide	zwischen beiden	wie Elter 489C
$R98_{61}$	wie Elter 176A	höher als beide	wie Elter 489C
$R98_{81}$	wie Elter 176A	höher als beide	wie Elter 489C
alle Rekombinanten haben den gleichen Methioninanteil am Rohprotein wie der Elter Mutante 489C			
489C	22,93	165,126	0,72
1201A	18,63	121,160	0,65
R163	zwischen beiden	zwischen beiden	wie Elter 489C
R177 B	zwischen beiden	zwischen beiden	wie Elter 489C
R224	höher als beide	zwischen beiden	weniger als beide
Rohprotein- und Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl liegen bei den Rekombinanten R163 und R177 Typ B zwischen dem für die Eltern festgestellten, der Methioninanteil am Rohprotein ist gleich dem des Elters 489C; Rekombinante 224 hat einen erhöhten Rohproteingehalt, der Methioningehalt ist geringer, dadurch ist der Methioninanteil am Rohprotein auch geringer als bei beiden Eltern			

Bei den anderen Rekombinanten - verschiedene Kreuzungen mit der Mutante 68C - zeigt es sich, daß auch hier sich der Methioningehalt des Elters mit dem höheren Wert durchzusetzen scheint; dies führt bei der Rekombinante R354 zu einem wesentlich erhöhten Methioninanteil am Rohprotein der Samen.

Abschließend ist zu bemerken, daß sowohl der Methionin- als auch der Lysingehalt pro 100 mg Samenmehl der Mutanten und Rekombinanten im Vergleich zur Ausgangsform erhöht ist, ebenso der Methioninanteil am Rohprotein, auch wenn der Rohproteingehalt niedriger liegt als der der Ausgangsform.

Zwischen Rohprotein und Lysinanteil am Rohprotein besteht - bei Betrachtung der Mutanten und Rekombinanten - eine Korrelation, die auf dem unterschiedlichen Rohproteingehalt der Genotypen beruht und die auf einem höheren Niveau liegt als die Ausgangsform.

5.7. Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen bezogen auf die Pflanze

Bei der Beurteilung des Wertes einer Nutzpflanze müssen auch Faktoren wie beispielsweise Samenproduktion, Tausendkorngewicht, assimilatorische Oberfläche, Standfestigkeit mit berücksichtigt werden. So ist es möglich, daß Pflanzen zwar Samen mit guter qualitativer Rohproteinzusammensetzung haben, deren Selektionswert aber aufgrund nicht optimaler Wachstumsverhältnisse eingebüßt wird.

Die Erträge (= Samenzahl pro Pflanze) der hier untersuchten Genotypen sind starken jährlichen Schwankungen ausgesetzt. Das gleiche gilt auch für das Tausendkorngewicht und die jährlichen sowie standortbedingten Unterschiede im Rohproteingehalt der Samen (HIEMKE 1973). Es ist daher schwierig, konkrete Aussagen über diese Merkmalswerte zu machen oder Beziehungen zwischen den Merkmalen herzustellen. Aus diesem Grunde sollen die Untersuchungsergebnisse auf die Daten bezogen werden, die für das Jahr 1971 Standort Landgrafenweg ermittelt wurden, soweit diese vorhanden sind. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Schwankungen, die bei Ertrag, Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt der Samen von Jahr zu Jahr auftreten.

Es zeigt sich, daß der Variationskoeffizient zwar unter 33 % liegt (nur bei der Ertragsbestimmung für Mutante 489C liegt er darüber), die Schwankungen aber doch ausgeprägt sind und das in unterschiedlichem Maße.
Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt pro 100 g Trockensamenmehl in etwa (bis auf die der Mutante 489C und der Rekombinante R177 Typ I) für die ein-

Tabelle 10: Ertrag, Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht der untersuchten Genotypen

Genotyp	Ertrag 1)				Tausendkorngewicht 2)				Rohproteingehalt 3)			
	n	$\bar{x}$	s	v	n	$\bar{x}$	s	v	n	$\bar{x}$	s	v
NF	3	24,54	4,17	16,46	9	282,41	26,27	9,30	9	23,46•	2,20	9,38
46C	3	18,99	2,33	12,34	3	281,70	23,09	8,20	3	22,77•	1,58	6,94
68C	3	24,02	4,49	18,10	4	278,50	22,10	7,94	3	21,04•	1,62	7,70
176A	2	23,44	0,25	1,07	3	201,85	25,07	12,42	1	23,77	-	-
251	1	30,00	-	-	3	228,21	16,55	7,25	3	23,92•	1,78	7,44
489C	3	50,44	15,34	34,70	4	173,20	41,43	23,92	7	23,44•	1,60	6,83
1201A	3	28,48	4,59	16,62	4	270,92	32,25	11,90	3	21,49•	2,48	11,54
$R18_{37}$	-	-	-	-	1	207,50	-	-	1	23,94	-	-
$R18_{52}$	1	18,80	-	-	-	-	-	-	1	21,95	-	-
R20D	1	54,70	-	-	1	204,37	-	-	1	24,48	-	-
R78	2	26,95	0,92	3,45	1	228,14	-	-	1	21,16	-	-
$R98_{61}$	-	-	-	-	2	175,90	23,49	13,35	1	24,12	-	-
$R98_{81}$	1	30,24	-	-					1	24,01	-	-
R163	2	25,98	0,58	2,21	1	232,68	-	-	1	19,64	-	-
R177 Typ B	3	37,37	0,81	2,19	2	193,30	40,43	20,92	2	20,57•	2,35	11,42
R224	3	36,43	10,29	29,07	2	236,91	13,09	5,43	1	24,85	-	-
R312	3	21,08	3,03	14 30	3	266,93	14,87	5,57	1	21,99	-	-
R328	2	19,22	1,90	10,11	1	208,70	-	-	1	24,07	-	-
R354	3	24,58	6,00	23,79	3	246,31	28,60	11,61	1	18,74	-	-

n = Anzahl der Jahre
$\bar{x}$ = Durchschnitt
s = Standardabweichung
v = Variationskoeffizient in %
• WOLFF 1973

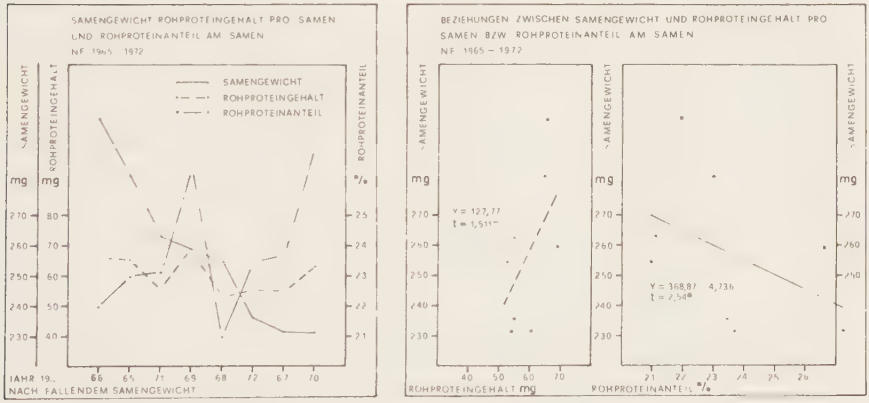
1) Anzahl der Samen pro Pflanze
2) Tausendkorngewicht in g
3) Rohproteingehalt der Samen in g pro 100 g Samenmehl Trockengewicht

zelnen Genotypen den gleichen Variationskoeffizienten aufweisen und dieser geringer ist als der für den Ertrag errechnete (Ausnahmen sind die Mutante 176A und die Rekombinante R177 Typ B). Das bedeutet, daß besonders bei Bezugnahme auf den Ertrag

mit Vorsicht zu interpretieren ist, während Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt pro 100 mg Samenmehl Trockengewicht in etwa den gleichen Schwankungen ausgesetzt sein könnten.

Aus der folgenden Abbildung (Abbildung 16) geht jedoch hervor, daß zwischen Samengewicht und Rohproteingehalt pro Samenkorn keine signifikante Beziehung besteht. Für die folgenden Berechnungen wurde das Tausendkorn- bzw. Samengewicht des getrockneten Samenkorns verwandt, um Schwankungen, die durch unterschiedlichen Wassergehalt entstehen, auszuschließen.

Abbildung 16: Beziehungen zwischen Samengewicht und Rohproteingehalt pro Samenkorn bzw. Rohproteinanteil am Samenkorn
Ausgangsform 1965 bis 1972 Landgrabenweg



Der sich errechnende signifikante Zusammenhang zwischen Samengewicht und Rohproteinanteil am Samenkorn muß noch weiter abgesichert werden, wenn weiteres Datenmaterial vorliegt. Nach den vorliegenden Daten scheint der Rohproteingehalt pro Samenkorn bei der Ausgangsform, sieht man einmal von dem Wert für 1969 ab, relativ konstant zu sein. Sollte dies sich als rich-

tig erweisen, wäre der Zusammenhang zwischen Samengewicht und Rohproteinanteil am Samenkorn erklärt. Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß wahrscheinlich einem fallenden Samengewicht ein steigender Rohproteinanteil pro Samenkorn gegenüber steht - bedingt dadurch, daß der Rohproteingehalt pro Samenkorn eine unveränderliche Größe ist. Die hier aufgezeigten Schwankungen wären als zufällig zu betrachten, ein höheres Samengewicht bedingt nicht einen höheren Rohproteingehalt pro Samenkorn, sondern das unterschiedliche Samengewicht müßte auf der Zunahme bzw. Abnahme anderer Inhaltstoffe (außer Wasser, da alle Daten auf das Trockengewicht bezogen sind) beruhen.

Um eine Aussage über Fragen im Zusammenhang mit dem Ertrag machen zu können, liegen zur Zeit noch nicht genügend Daten vor. Daher soll hier nur für einige Genotypen aufgezeigt werden, wie sich im Zeitraum von drei Jahren Ertrag und Samengewicht darstellen.
In Abbildung 17 sind für die Ausgangsform und drei Mutanten sowie eine Rekombinante die Erträge, Samengewichte und die Kornerträge(= Samengewicht pro Pflanze) dargestellt. Die Daten sind angeordnet nach steigendem Samengewicht. Aus der Abbildung ist deutlich zu ersehen, daß zwischen Samengewicht und Samenzahl pro Pflanze keine Beziehung besteht.

In Abbildung 18 ist die hierzu durchgeführte Regressionsrechnung dargestellt, die ein nicht signifikantes Ergebnis aufzeigt.
Zwischen Samengewicht pro Pflanze (=Kornertrag) und Samenzahl pro Pflanze muß jedoch eine Beziehung bestehen, da die in die Berechnung aufgenommenen Genotypen (NF, 68C, 1201A, R312) sich im Samengewicht nicht wesentlich unterscheiden und in die Berechnung des Kornertrages das Samengewicht eingeht; bei steigender Samenzahl pro Pflanze muß daher auch der Kornertrag steigen.
Für die Berechnung mußten die Daten mehrer Genotypen herangezogen werden, da für einen Genotypen jeweils nur drei Werte vorlagen.

Abbildung 17: Samengewicht, Samenzahl pro Pflanze und Samengewicht pro Pflanze der Genotypen NF, 68C, 489C 1201A und R312 für die Jahre 1970 bis 1972 Landgrabenweg

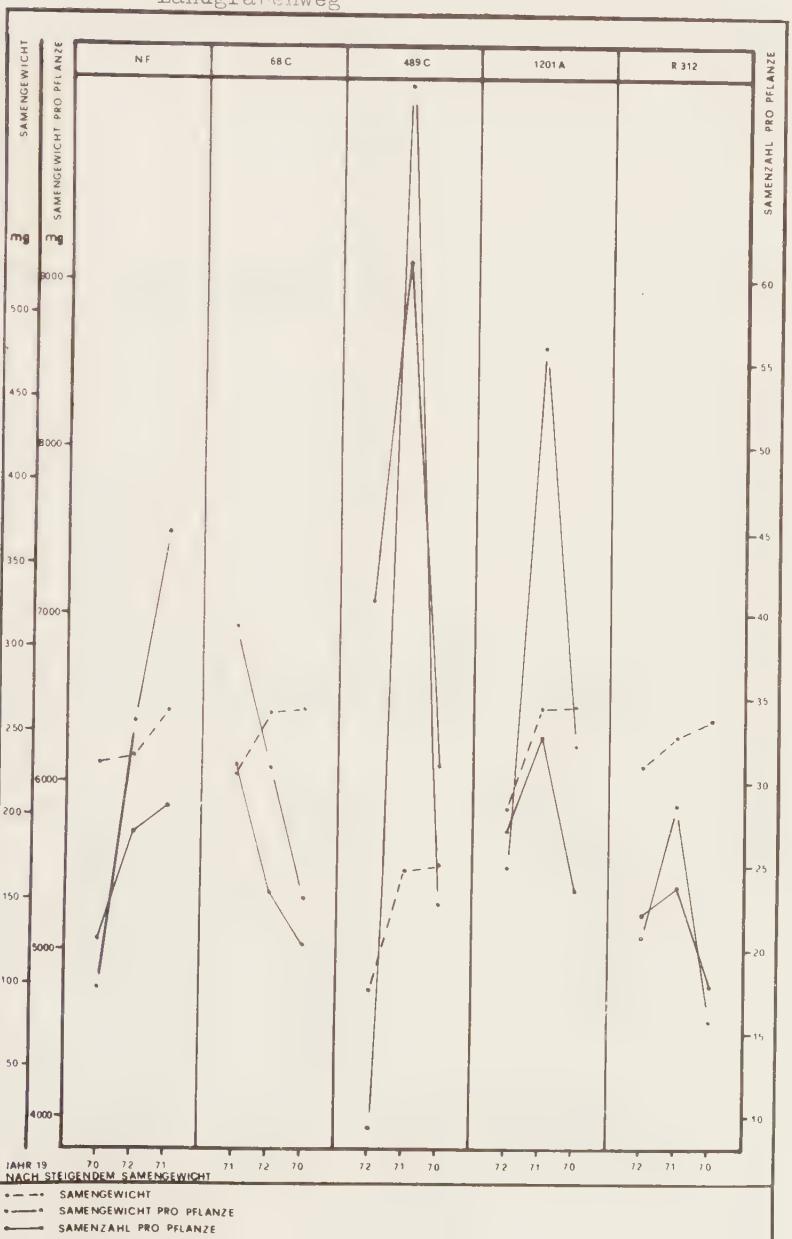
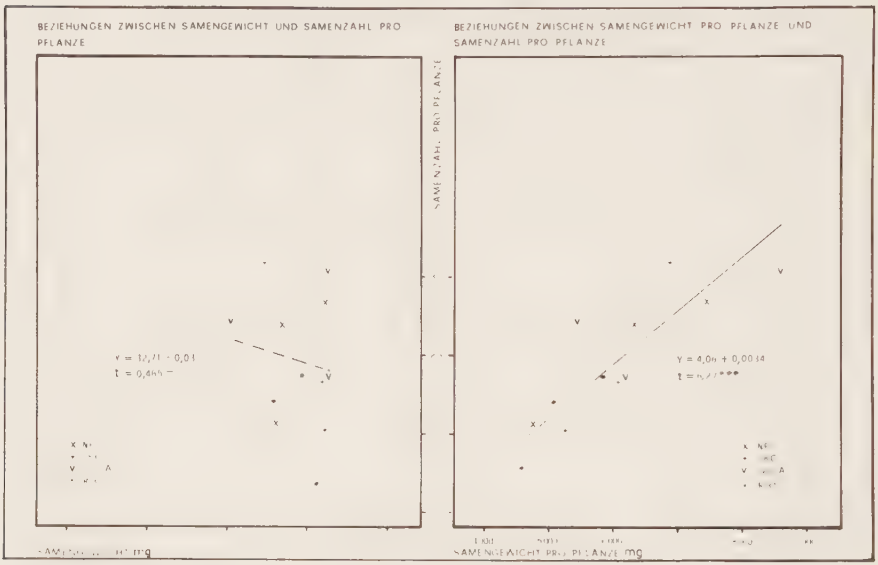


Abbildung 18: Beziehungen zwischen Samenzahl pro Pflanze und Samengewicht bzw. Samengewicht pro Pflanze



Es ist an dieser Stelle nochmals darauf hinzuweisen, daß in Bezug auf Tausendkorngewicht (und damit auch Samengewicht) und vor allem Ertrag die Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten sind, da sie einer weiteren Absicherung mit erweitertem Datenmaterial bedürfen.

In den folgenden Tabellen sind für die untersuchten Genotypen Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt pro Samen (Tabelle 11) sowie Ertrag, Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- Lysingehalt der Samen pro Pflanze (Tabelle 13) des Jahres 1971, Standort Landgrabenweg, aufgeführt. Die dazu angefertigten Abbildungen dienen einem Vergleich der Genotypen untereinander.

Es zeigt sich, daß zwischen den Genotypen Unterschiede bestehen - wobei nicht gesagt werden kann, ob diese zufällig oder

signifikant sind und daß vor allem Mutante 489C mit einem Ertrag von 61,00 Samen pro Pflanze stark herausfällt. Wie aus Tabelle 10 (siehe Seite 70) zu ersehen ist, liegt aber der Variationskoeffizient auch gerade bei diesem Genotyp besonders hoch, so daß dieser Ertrag nicht als repräsentativ betrachtet werden kann. Das gleiche gilt für die Rekombinanten R224 und R354 sowie R20D, bei letzterer liegt bisher nur ein Wert vor. Die im Zusammenhang mit dem Ertrag berechneten Daten (Tabelle 13) sind daher entsprechend zu werten.

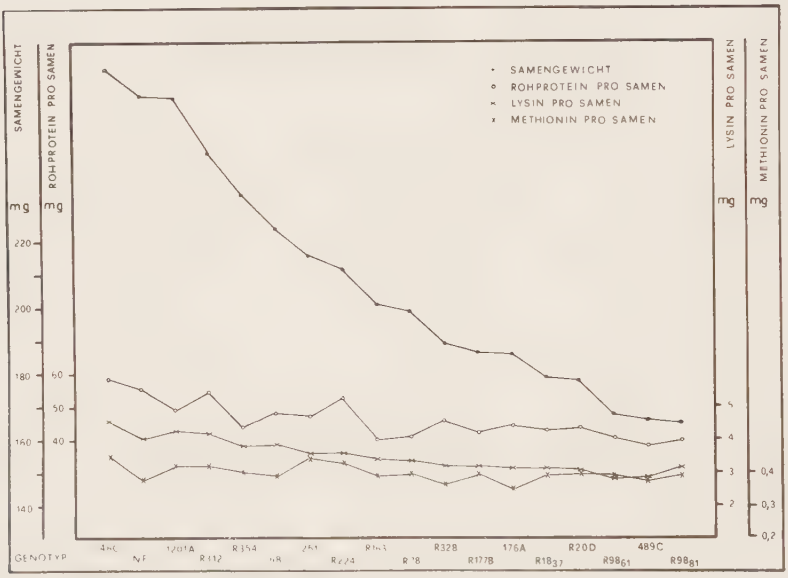
Tabelle 11: Gewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen der untersuchten Genotypen
Landgrabenweg 1971

Genotyp	Samengewicht mg	Rohproteingehalt pro Samen mg	Methioningehalt pro Samen mg	Lysingehalt pro Samen mg
NF	263,85	55,54	0,283715	4,084759
46C	272,81	58,41	0,352713	4,597460
68C	224,17	48,13	0,291000	3,846585
176A	185,96	44,20	0,253324	3,145647
251	215,59	47,47	0,347650	3,619314
489C	166,17	38,10	0,274390	2,843772
1201A	263,77	49,14	0,319584	4,138690
$R18_{37}$	178,97	42,85	0,289119	3,192995
$R18_{52}$	-	-	-	-
R20D	178,21	43,63	0,301013	3,096304
R78	198,94	42,09	0,295004	3,359138
$R98_{61}$	167,58	40,42	0,288397	2,833202
$R98_{81}$	165,56	39,75	0,289730	3,160655
R163	201,15	39,51	0,291531	3,416726
R177 TypB	186,58	41,48	0,297955	3,199797
R224	211,45	52,55	0,328099	3,265923
R312	247,18	54,35	0,320014	4,218709
R328	189,02	45,50	0,259018	3,199262
R354	234,26	43,90	0,303779	3,837875

Im folgenden sollen erst die auf das Samenkorn bezogenen Daten dargestellt werden, dann die auf die gesamte Pflanze bezogenen Werte (Tabelle 13 siehe Seite 82).

Abbildung 19 zeigt die in Tabelle 11 aufgeführten Daten. Die Genotypen sind nach fallendem Samengewicht angeordnet.

Abbildung 19: Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen der untersuchten Genotypen Landgrabenweg 1971

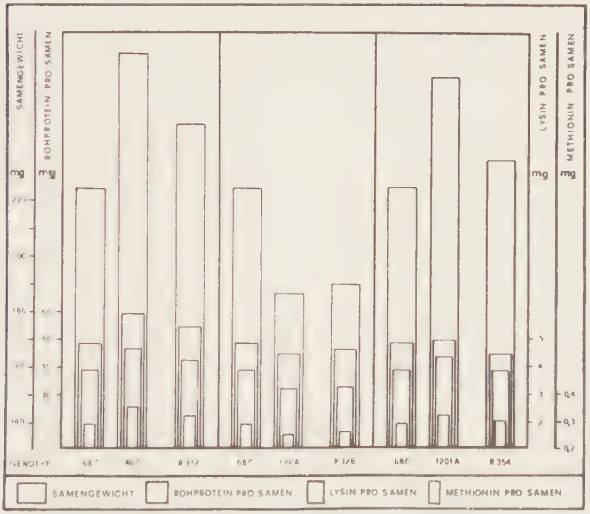


Der Unterschied zwischen den Samen mit dem höchsten und denen mit dem niedrigsten Wert für das jeweilige Merkmal liegt bei 35 bis 40 %. Beim Vergleich der Samen zeigt sich, daß die der Ausgangsform - immer bezogen auf das Jahr 1971 - nur von denen der Mutante 46C in Bezug auf die hier aufgeführten Merkmale übertroffen werden. Nur in Bezug auf den Lysingehalt pro Samen zeigen auch die Mutante 1201A und die Rekombinante R312 besse-

re Werte. Der Methioningehalt pro Samen liegt bei der Ausgangsform sehr niedrig, nur die Rekombinante R328 und die Mutante 176A liegen noch darunter.

Von Interesse ist vor allem ein Vergleich der Eltern und Rekombinanten. In den folgenden Abbildungen (Abbildung 20 und 21) sind die Samengewichte, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalte der Samen graphisch dargestellt.

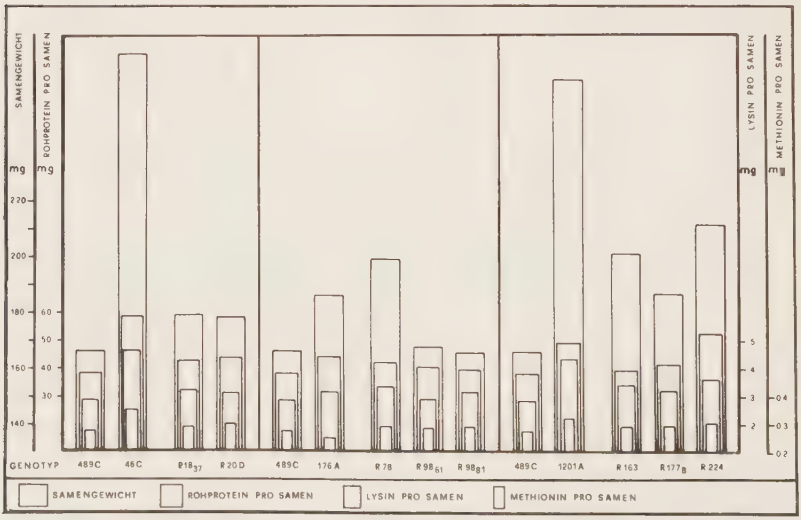
Abbildung 20: Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen
Eltern und Rekombinanten im Vergleich
I. Kreuzungen mit Mutante 68C
Werte Landgrabenweg 1971



Rekombinante R312 scheint in Bezug auf alle Merkmale Samen zu haben, deren Werte zwischen denen beider Eltern liegen (Kreuzung 68Cx46C). Bei der Kreuzung 68Cx176A sieht es so aus, als sei die Rekombinante R328 dem Elter 176A gleich; die besseren Werte der Samen der Mutante 68C wären damit bei der Rekombina-

tion zumindest phänotypisch nicht zum tragen gekommen. Rekombinante R354 zeigt in ihren Samen Merkmalswerte der Samen beider Eltern (Mutanten 68C und 1201A). Samengewicht und Methioningehalt pro Samen liegen zwischen denen der beiden Eltern, der Rohproteingehalt pro Samen unter dem beider Eltern, ebenso der Lysingehalt pro Samen. Die Differenz zwischem dem Lysingehalt pro Samen der Rekombinante R354 und dem Elter Mutante 1201A ist allerdings sehr gering, da der Lysingehalt pro 100 mg Samenmehl bei Mutante 68C an der oberen, bei Mutante 1201A und Rekombinante R354 an der unteren Grenze liegt. Der zufällig fast gleiche Wert bei Elter 68C und Rekombinante R354 ist also nicht auf den Einfluß des Elters 68C zurückzuführen.

Abbildung 21: Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen
Eltern und Rekombinanten im Vergleich
II. Kreuzungen mit Mutante 489C
Werte Landgrabenweg 1971



Die Rekombinanten, die aus Kreuzungen mit der Mutante 489C hervorgingen, haben bis auf die, dessen anderer Elter Mutante 176A ist, ein Samengewicht, das zwischen dem der beiden Eltern liegt. Rekombinante $R98_{61}$ und $R98_{81}$ weisen das gleiche niedrige Samengewicht des Elters 489C auf, Rekombinante R78 hat ein Samengewicht das größer als das beider Eltern ist.

Bei den Rekombinanten $R18_{37}$ und R20D (beide 489Cx46C) liegen Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen zwischen den Werten der beiden Eltern.
Rekombinante R78 hat den Eltern 489C und 176A gegenüber einen erhöhten Methionin- und Lysingehalt pro Samen, der Rohproteingehalt pro Samen liegt zwischen dem beider Eltern, wie auch bei den beiden anderen Rekombinanten dieser Kreuzung, $R98_{61}$ und $R98_{81}$. Der Methioningehalt pro Samen ist bei beiden Rekombinanten den Eltern gegenüber erhöht, während der Lysingehalt pro Samen bei Rekombinante $R98_{61}$ gleich dem Elter 489C, bei Rekombinante $R98_{81}$ gleich dem Elter 176A ist.
Das Samengewicht der Rekombinanten der Kreuzung 489Cx1201A liegt bei allen drei Rekombinanten zwischen dem der Eltern, ebenso der Rohproteingehalt pro Samen, bis auf den der Rekombinante R224, der höher liegt als der beider Eltern.Das gleiche gilt für den Methioningehalt, während der Lysingehalt pro Samen bei allen Rekombinanten zwischen den Werten für die beiden Eltern liegt.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 12) sind die Verhältnisse bei den Samen der Eltern und Rekombinanten nochmals zusammengestellt, um die Zusammenhänge etwas deutlicher zu machen.

Generell läßt sich sagen, daß bei diesen Kreuzungnen die Merkmale Samengewicht, Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen nicht auf ein höheres Niveau gebracht werden konnten als bei den Eltern schon vorhanden war. Meist wurde der Wert des Elters realisiert, der den niedrigsten Merkmalswert hat. Nur bei der Rekombinanten R78 ist durch die Kombination der jeweils besseren Werte der beiden Eltern ein Genotyp entstanden, der den beiden Eltern in Bezug auf die hier untersuchten Merk-

Tabelle 12: Vergleich der Samen der Rekombinanten mit denen ihrer Eltern

Werte Landgrabenweg 1971

Rekombinante	Samengewicht	Gehalt an ... pro Samen			Gehalt an ... pro 100 mg Samenmehl = prozentualer Anteil am Samen		
		Rohprotein	Methionin	Lysin	Rohprotein	Methionin	Lysin
R312 (68Cx46C)	zwischen dem beider Eltern - 46C höher als 68C -				gleich beiden Eltern		
Rekombinante und Eltern haben anteilsmäßig die gleiche Samenzusammensetzung; pro Samenkorn unterscheiden sie sich durch das unterschiedliche Samengewicht							
R328 (68Cx176A)	gleich dem Elter 176A - Elter 68C ist höher -				gleich Elter 176A ist kleiner	- 68C	gleich beiden Eltern
Rekombinante R328 ist in Bezug auf die hier untersuchten Merkmale dem Elter 176A gleich							
R354 (68ex1201A)	zwischen dem beider Eltern 1201A höher als 68C	unter dem Wert beider Eltern	zwischen dem beider Eltern 1201A höher als 68C	unter dem Wert beider Eltern	gleich dem Elter 1201A 68C höher	gleich dem Elter 68C 1201A niedriger	gleich beiden Eltern
Rohprotein- und Lysingehalt der Rekombinanten sind prozentual gleich dem des Elters 1201A; durch das niedrige Samengewicht liegt der absolute Wert unter dem beider Eltern; der Methioningehalt der Rekombinanten ist prozentual gleich dem des Elters 68C, absolut liegt er daher zwischen den beiden Eltern							
R1837 (489Cx46C)	zwischen dem beider Eltern - 46C höher als 489C -				größer als beide Eltern	gleich dem Elter 489C 46C kleiner	größer als beide Eltern
Durch das niedrige Samengewicht werden die prozentual höheren Rohprotein- und Lysingehalte aufgehoben - absolut liegen die Werte der Samen der Rekombinanten zwischen denen der Eltern							
R200 (489Cx46C)	zwischen dem beider Eltern - 46C höher als 489C -				größer als beide Eltern	gleich dem Elter 489C 46C kleiner	gleich beiden Eltern
Durch das niedrige Samengewicht wird der prozentual höhere Rohproteingehalt aufgehoben - die Werte für den Samen der Rekombinanten liegen zwischen denen der Eltern							
R78 (489Cx176A)	größer als das beider Eltern	zwischen dem beider Eltern 176A höher als 489C	größer als beide Eltern		unter dem Wert beider Eltern	gleich dem Elter 489C 176A kleiner	gleich beiden Eltern
Der geringe prozentuale Rohproteingehalt wird durch das hohe Samengewicht absolut gesteigert, so daß der Rohproteingehalt pro Samen höher liegt als der des Elters 489C, Methionin- und Lysingehalt liegen aufgrund des hohen Samengewichtes pro Samen über dem Wert beider Eltern							
R9861 (489Cx176A)	gleich dem Elter 489C 176A höher als 489C	zwischen dem beider Eltern 176A höher als 489C	größer als beide Eltern	gleich dem Elter 489C 176A höher als 489C	gleich dem Elter 176A 489C kleiner	gleich dem Elter 489C 176A kleiner	gleich beiden Eltern
Samengewicht, Methionin- und Lysingehalt pro Samen sind bei der Rekombinanten gleich dem des Elters 489C (der Methioningehalt liegt etwas höher, da er prozentual an der oberen Grenze liegt); durch den höheren Rohproteinanteil liegt der Rohproteingehalt pro Samen zwischen dem Wert beider Eltern							

Fortsetzung Seite 81

Tabelle 12: Vergleich der Samen der Rekombinanten mit denen ihrer Eltern

Werte Landgrabenweg 1971 Fortsetzung

Rekombinante	Samengewicht	Gehalt an .. pro Samen			Gehalt an ... pro 100 mg Samenmehl = prozentualer Anteil am Samen		
		Rohprotein	Methionin	Lysin	Rohprotein	Methionin	Lysin
$R98_{61}$ (489Cx176A)	gleich dem Elter 489C 176A größer als 489C	zwischen den beider Eltern 176A größer als 489C	größer als beide Eltern	gleich dem Elter 176A 176A größer als 489C	gleich dem Elter 176A 176A größer als 489C	gleich dem Elter 489C 489C größer als 176A	größer als beide Eltern
Gleiche Verhältnisse wie bei Rekombinante $R98_{61}$, nur der Lysingehalt ist prozentual so viel höher als der beider Eltern, daß pro Samenkorn der hohe Wert des Elters 176A erzielt wird							
R163 (489Cx1201A)	zwischen dem beider Eltern - 489C kleiner als 1201A -				kleiner als beide Eltern	gleich dem Elter 489C 1201A kleiner	gleich dem beider Eltern
Prozentual liegen die Werte in Höhe des Elters mit dem niedrigen Samengewicht (Elter 489C) bzw. niedriger (Rohproteinanteil). Durch das höhere Samengewicht liegt die Rekombinante bezogen auf die absoluten Werte zwischen denen beider Eltern							
R177 Typ B (489Cx1201A)	zwischen dem beider Eltern - 489C kleiner als 1201A -				zwischen den Eltern 489C größer als 1201A	gleich dem Elter 489C 1201A kleiner	gleich beiden Eltern
Es zeigt sich das gleiche wie bei Rekombinante R163, nur daß hier der Rohproteinanteil höher liegt, absolut aber auch zwischen den Werten beider Eltern							
R224 (489Cx1201A)	zwischen dem beider Eltern 1201A größer als 489C	größer als der beider Eltern	zwischen dem beider Eltern - 1201A größer als 489C		größer als beide Eltern	gleich dem Elter 1201A 489C größer als 1201A	gleich beiden Eltern
Der Lysingehalt der Rekombinanten liegt prozentual zwischen dem der Eltern, ebenso das Samengewicht, also auch der absolute Lysingehalt; der prozentual höhere Rohproteingehalt bleibt auch absolut höher, der geringe prozentuale Methioningehalt liegt absolut zwischen den Werten der beiden Eltern							

malswerte überlegen ist. Ein Modell für den Einbau bestimmter Werte des einen Elters in die Rekombinante und anderen des zweiten Elters läßt sich jedoch nicht aufbauen - es ist dem Zufall überlassen.

Tabelle 13 enthält die auf die Pflanze bezogenen Merkmale Samenzahl, Samengewicht, Samenrohprotein-, Samermethionin- und

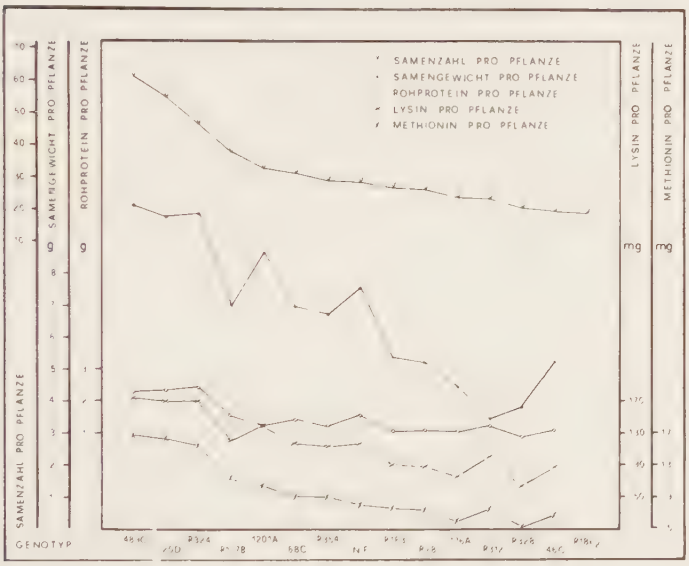
Samenlysingehalt, die in Abbildung 22 graphisch dargestellt sind. Die Genotypen wurden nach fallender Samenzahl pro Pflanze angeordnet.

Tabelle 13: Samenzahl, Samengewicht, Samenrohprotein pro Pflanze sowie Methionin- und Lysingehalt der Samen pro Pflanze der untersuchten Genotypen
Werte Landgrabenweg 1971

Genotyp	Ertrag 1)	Kornertrag in g 2)	Rohprotein in g 3)	Methionin in mg 4)	Lysin in mg 5)
NF	28,47	7.51181	1,581224	8,077366	116,293089
46C	19,10	5,21067	1,115631	6,736818	87,811486
68C	30,90	6,92685	1,487217	8,991900	118,859477
176A	23,70	4,40725	1,046540	6,003779	74,551834
251	-	-	-	-	-
489C	61,00	10,13637	2,324100	16,737790	173,470092
1201A	32,58	8,59363	1,275181	10,412047	140,702920
R 18_{37}	-	-	-	-	-
R 18_{52}	18,80	-	-	-	-
R 20D	54,70	9,74809	2,386561	16,465411	169,367829
R 78	26,00	5,17244	1,094340	7,670104	87,337588
R 98_{61}	-	-	-	-	-
R 98_{81}	-	-	-	-	-
R163	26,60	5,35059	1,050966	7,754725	90,884912
R177 TypB	37,60	7,01541	1,559648	11,203108	120,312367
R224	46,70	9,87472	2,454085	15,322223	169,330604
R312	23,70	3,48817	1,288095	7,584332	99,983237
R328	20,10	3,79930	0,914550	5,206262	64,305166
R354	28,60	6,69984	1,255540	8,991858	113,601100

1) Samenzahl pro Pflanze
2) Samengewicht pro Pflanze
3) Rohproteingehalt der Samen pro Pflanze
4) Methioningehalt der Samen pro Pflanze
5) Lysingehlt der Samen pro Pflanze

Abbildung 22: Samenzahl, Samengewicht, Samenrohprotein pro Pflanze sowie Methionin- und Lysingehalt der Samen pro Pflanze
Werte Landgrabenweg 1971

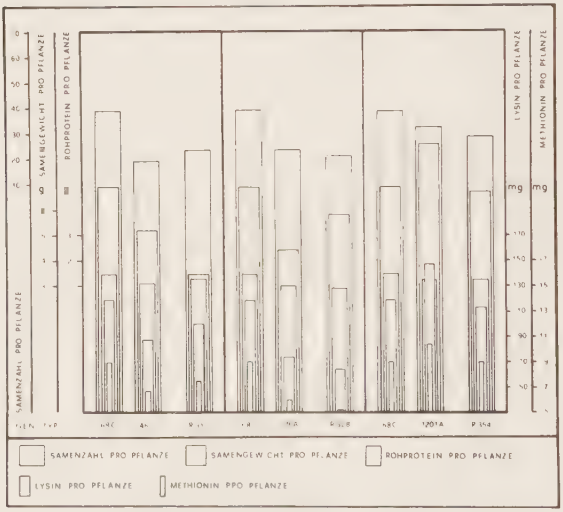


Der Unterschied zwischen dem Genotyp mit dem höchsten und dem mit den niedrigsten Wert für das jeweilige Merkmal liegt bei 60 bis 70 %. Ein Vergleich der Mutanten und Rekombinanten mit der Ausgangsform zeigt, daß diese ungefähr in der Mitte liegt, es also in Bezug auf die Pflanze Mutanten und Rekombinanten mit besseren bzw. schlechteren Werten für die Merkmale Samengewicht und Samenzahl pro Pflanze sowie Rohprotein-, Methionin- und Lysingehalt der Samen pro Pflanze nach den Daten für 1971, Landgrabenweg, gibt, bedingt vor allem durch die höhere bzw. niedrigere Samenzahl pro Pflanze.

In den Abbildungen 23 und 24 sind die Rekombinanten im Vergleich mit den jeweiligen Eltern dargestellt. Der Bezug auf die

Pflanze zeigt ein anderes Bild als der auf den Samen; durch die Einbeziehung des Faktors "Samenzahl pro Pflanze" kommt es zu wesentlichen Verschiebungen.

Abbildung 23: Samenzahl, Samengewicht, Samenrohprotein pro Pflanze sowie Methionin- und Lysingehalt der Samen pro Pflanze
Eltern und Rekombinanten im Vergleich
I. Kreuzungen mit Mutante 68C
Werte Landgrabenweg 1971

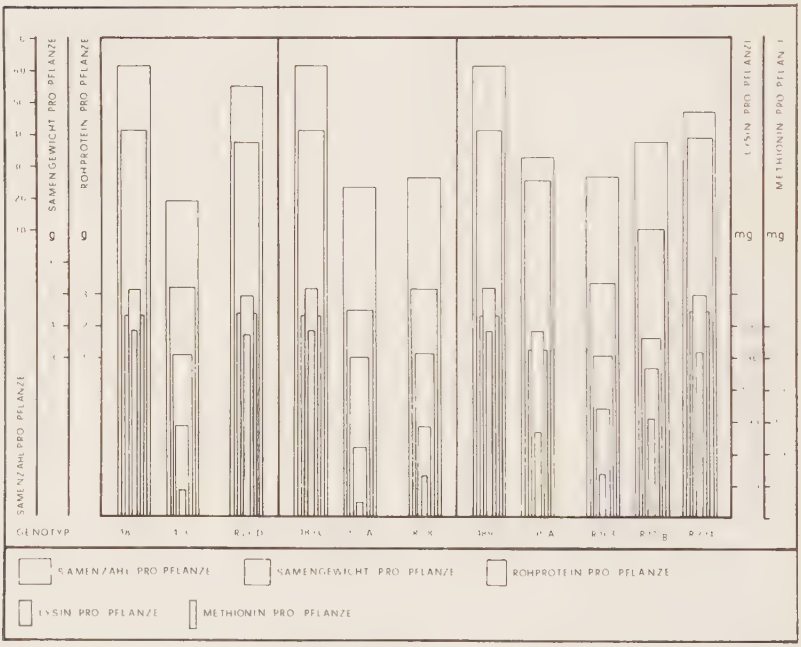


Die hohe Samenzahl der Mutante 68C hat keine der Rekombinanten aus Kreuzungen mit dieser Mutante. Bei allen Rekombinanten, deren einer Elter die 68C ist, ist die Samenzahl pro Pflanze niedriger als die beider Eltern - eine Ausnahme macht Rekombinante R312, die etwas höher liegt als der Elter 46C. Die Folge ist, daß auch alle anderen Merkmale (Samenrohprotein, Samenmethionin, Samenlysin und Kornertrag) auf die Pflanze bezogen

niedriger liegen als die des Elters 68C.
Rekombinante R312 (68Cx46C), beim Vergleich der Samen zwischen den Eltern liegend, zeigt ein beiden Eltern gegenüber erniedrigtes Samengewicht pro Pflanze, die anderen Merkmalswerte liegen auch beim Bezug auf die Pflanze zwischen denen der Eltern.
Rekombinante R328 (68Cx176A) konnte in Bezug auf den Samen als dem Elter 176A gleich angesehen werden, bei Betrachtung der gesamten Pflanze liegen, bis auf das Samengewicht pro Pflanze, alle Werte niedriger als die der beiden Eltern. Der Kornertrag liegt zwischen den Werten für die Eltern 68C und 176A.
Rekombinante R354 (68Cx1201A) weist ein beiden Eltern gegenüber reduziertes Samengewicht pro Pflanze auf; das Samengewicht liegt zwischen dem der Eltern. Der Rohproteingehalt der Samen pro Pflanze liegt in gleicher Höhe wie der des Elter 1201A, der des Elter 68C liegt höher, in Bezug auf den Samen ist der Rohproteingehalt der Rekombinanten niedriger als der beider Eltern. Der Lysingehalt der Samen pro Pflanze liegt unter dem Wert beider Eltern, der Methioningehalt der Samen wie auch der Samen pro Pflanze zwischen den für die Eltern ermittelten Werte.

Mutante 489C hat für das Jahr 1971 eine extrem hohe Samenzahl, ebenso die Rekombinanten R20D (489Cx46C) und R224 (489Cx1201A), die anderen Kreuzungen mit Mutante 489C liegen mit ihrem Ertrag in Höhe des jeweiligen anderen Elters.
Rekombinante R20D (489Cx46C) liegt in Bezug auf den Samen mit den hier dargestellten Merkmalswerten zwischen denen der beiden Eltern. Durch die hohe Samenzahl pro Pflanze, die der des Elters 489C angenähert ist, sind in Bezug auf die Pflanze auch die anderen Merkmalswerte denen der Mutante 489C angeglichen, die wesentlich höher liegen als die des anderen Elters 46C.
Rekombinante R78 (489Cx176A), in Bezug auf den Samen bis auf das Rohprotein pro Samen, das zwischen den Werten für die beiden Eltern liegt, höher liegend als beide Eltern, hat durch die geringe Samenzahl pro Pflanze, die in Höhe des Elters 176A

Abbildung 24: Samenzahl, Samengewicht, Samenrohprotein pro Pflanze sowie Methionin- und Lysingehalt der Samen pro Pflanze
Eltern und Rekombinanten im Vergleich
II. Kreuzungen mit Mutante 489C
Werte Landgrabenweg 1971



liegt, in Bezug auf die Pflanze Merkmalswerte, die zwischen denen der Eltern liegen. Nur der Rohproteingehalt der Samen pro Pflanze liegt hier jetzt in Höhe des Elters 176A (niedriger als der des Elters 489C).
Rekombinante R163 (489Cx1201A) liegt mit allen Merkmalswerten niedriger als beide Eltern, die beiden anderen Rekombinanten dieser Kreuzung weisen Werte auf, die zwischen denen der Eltern liegen - bis auf den Lysingehalt der Samen pro Pflanze

bei der Rekombinanten R177 Typ B, der unter dem Wert beider Eltern liegt. In Bezug auf den Samen liegen bei allen Rekombinanten der Kreuzung 489Cx1201A die Merkmalswerte zwischen denen der Eltern, Ausnahme ist nur der Rohproteingehalt pro Samen der Rekombinante R224, der höher als der beider Eltern liegt.

Es zeigt sich, daß es durch die Aufnahme des Merkmals "Samenzahl pro Pflanze" in die Berechnungen und Betrachtungen zu wesentlichen Verschiebungen bei der Beurteilung des Genotyps kommt. Mutante 489C scheint in Bezug auf die Pflanze so die vorteilhafteste zu sein, d.h. der Genotyp mit den höchsten Merkmalswerten; in Bezug auf den Samen steht sie an letzter Stelle der untersuchten Mutanten. Bei Mutante 46C ist es genau umgekehrt, sie schneidet in Bezug auf den Samen am vorteilhaftesten ab, ist aber in Bezug auf die gesamte Pflanze durch ihre schlechte Samenproduktion pro Pflanze im Jahr 1971 der schlechteste der hier untersuchten Genotypen.

Da aber, wie schon erwähnt, das Merkmal "Samenzahl pro Pflanze" eine von Genotyp zu Genotyp unterschiedlich schwankende Größe mit hohem Variationskoeffizienten ist (siehe Seite 70 Tabelle 10), sollte man bei der Bewertung der Genotypen auf dieses Merkmal erst zuletzt zurückgreifen, d.h. erst einmal die Qualität der Samen beurteilen. Dabei sind auch die prozentualen den absoluten Mengen vorzuziehen, da diese für die meisten Fragestellungen eine bessere Vergleichsbasis darstellen als die absoluten Werte. Diese kommen in Betracht, wenn beispielsweise auf Samengröße hin selektiert werden soll. Die Anzahl der Samen pro Pflanze ist dann von Interesse, wenn die Wirtschaftlichkeit eines Genotypen geprüft werden soll. Der ernährungsphysiologische Wert eines Samens wird durch den absoluten Rohproteingehalt pro Samen oder noch besser pro 100 mg Samen bestimmt, die Qualität dieses Rohproteins dann durch den Anteil der essentiellen Aminosäuren, vor allem durch den der an erster Stelle limitierenden Aminosäure - hier also Methionin.

Abschließend läßt sich also sagen, daß die Beurteilung eines Genotypen nicht generell nach einem bestimmten Schema vorgenommen werden kann, sondern daß, je nach Fragestellung, ein anderer Aspekt die Beurteilung bestimmen muß.

6. Diskussion

Proteine stellen eine umfangreiche Gruppe lebenswichtiger Moleküle dar, die für die Zellstruktur und -funktion und damit für den ganzen Organismus unentbehrlich sind. Vorkommen, Zusammensetzung und mengenmäßiger Anteil der Proteine sind für jeden Organismus spezifisch. Jede Zelle enthält eine spezielle Anzahl und individuelle Vielfalt an Proteinen, die vom genetischen Material der Zelle bestimmt wird. Dabei wird die Primärstruktur einzelner Proteine von einzelnen Genen determiniert (HARTMANN, SUSKIND 1972).

Entsprechend den Aufgaben unterscheidet man zwischen aktivem oder funktionellem und Reserveprotein. Erstere sind als Enzyme die wichtigen Determinanten und Regulatoren des Stoffwechsels und sind daher vor allem in den stoffwechselaktiven Organen lokalisiert. Reserveeiweiß dagegen findet sich hauptsächlich in den Speicherorganen der Pflanzen sowie in den Samen.

Betrachtet man die Samen, so ist die Menge der dort vorhandenen Proteine sehr unterschiedlich. Besonders reich an Eiweiß sind die Samen der Leguminosen. Hier wird deutlich, welche hohen Eiweißgehalte bei Pflanzen physiologisch möglich sind. Die stoffbildenden Vorgänge sind bei dieser Pflanzenfamilie zugunsten der Eiweißsynthese verschoben. Extrem hohe Proteingehalte sind aber wohl nur bei den Leguminosen möglich, weil die Bildung der Eiweißstoffe eine Gemeinschaftsleistung von Pflanze und stickstoffbindenden Knöllchenbakterien ist (ROEMER, RUDORF 1958). Einen Überblick über die Proteingehalte der Samen verschiedener Pflanzenarten gibt Tabelle 14.

In den Pflanzen vollzieht sich die Eiweißsynthese vor allem in den Blättern; zur Zeit der Fruchtreife und Samenbildung wird jedoch die Hauptmenge des Eiweißes nach erfolgtem Abbau zu Aminosäuren in die Samen transportiert. Dort werden die Aminosäuren wieder zu Proteinen synthetisiert und in den Keimblättern bzw. im Endosperm gespeichert.

Pflanze und Tier ist gemeinsam, daß vor der Eiweißneubildung die spezifische Struktur des Reserve- bzw. Nahrungsproteins

zerstört wird. Während die Pflanze in der Regel zur Synthese aller Aminosäuren befähigt ist, sind Menschen und Tiere auf die Zufuhr von essentiellen Aminosäuren über die Nahrung angewiesen. Aufgrund der besonderen Synthesemöglichkeit bei den Pflanzen wird auch die dort häufig anzutreffende, sehr einseitige Zusammensetzung der Reserveproteine verständlich.

Tabelle 14: Der Rohproteingehalt verschiedener Samen (nach MENGEL 1968)

Samen von	Rohproteinanteil	
Reis	6,9	
Mais	9,6	
Gerste	9,7	Süßgräser
Hafer	10,7	
Hirse	12,7	
Erbse	23,2	
Pferdebohne	25,3	
Wicke	25,9	Hülsenfrüchtler
Gelbe Lupine	38,3	

Für die menschliche bzw. tierische Ernährung hat das Reserveprotein der Pflanzen aber wegen der anderen Aminosäurezusammensetzung keinen so hohen physiologischen Wert. Aufgrund seiner biologischen Wertigkeit steht das Plasmaeiweiß der Pflanzenzelle dem tierischen Eiweiß näher. Von der Menge her tritt es aber hinter dem Reserveeiweiß zurück. Es muß folglich bei der Selektion proteinreicher Samen nicht nur auf den Proteingehalt, sondern auch auf die Aminosäurezusammensetzung der Proteine geachtet werden. Daraus ergeben sich ein quantitativer und ein qualitativer Aspekt: einerseits soll die Produktion an Protein gesteigert und andererseits die Proteinqualität verbessert werden.

Das Maß für die Quantität ist letztlich die Eiweißmenge je Hek-

tar, die sich aus der Kombination von Eiweißgehalt je Samen, der Anzahl der Samen pro Pflanze und der Zahl der Pflanzen je ha ergibt. Es ist schwierig, Pflanzen mit eiweißreichen Samen zu selektieren, denn die meisten quantitativen Merkmale und so auch der Proteingehalt der Samen stehen unter polygener Kontrolle (BRESCH, HAUSMANN 1970; GEISSLER 1972; SPERLICH 1973). Das einzelne Gen hat folglich einen verhältnismäßig geringen Einfluß auf den Phänotypus. Da diese Effekte nur schwach sind, kann der Einfluß der Umwelt auf die Wirksamkeit von Polygenen groß sein (BREWBAKER 1967). Bei polygener Kontrolle sind einfache Spaltungsverhältnisse nur äußerst selten zu finden. Daher können zur Einkreuzung eines Merkmals nur empirische Selektionsmethoden angewandt werden (BRESCH, HAUSMANN 1970) und die genetische Analyse bleibt auf die biometrische Annäherungsmethode beschränkt. Der genetische Erfolg der Selektion hängt oftmals von der Genauigkeit der vorgenommenen Varianzanalysen ab (BREWBAKER 1967).

Mit der polygenen Kontrolle quantitativer Merkmale ist in der Regel eine gewisse Varianz in den Merkmalsausprägungen verbunden. Die Nachkommen von Kreuzungen zeigen in den meisten quantitativen Merkmalen eine breite Streuung, die im allgemeinen zwischen der der benutzten Elternstämme liegt (BRESCH, HAUSMANN 1970; ROEMER, RUDORF 1958).

Die Samen der hier untersuchten Mutanten haben im Vergleich zur Ausgangsform einen gleichen, höheren oder niedrigeren Rohproteingehalt (vergl. Abb.4 Seite 49). Es ist zu klären, ob diese Unterschiede auf Mutationen beruhen oder durch die genetische Variabilität des Rohproteingehaltes gegeben sind. Da GOTTSCHALK und MÜLLER (1974) für den Rohproteingehalt von Samen der Ausgangsform eine Variationsbreite von 19 g bis 22 g pro 100 g Samenmehl Trockengewicht angeben und bei den hier untersuchten Mutanten vergleichbare Werte von 18,63 g bis 24,85 g ermittelt wurden, ist Mutation als Ursache für den unterschiedlichen Rohproteingehalt bei einigen Mutanten wahrscheinlich. Wie Abbildung 4 auf Seite 49 zeigt, liegen die Mutante 1201 A unterhalb der Variationsgrenzen der Aus-

gangsform, die Mutanten 489C und 176A darüber und die Mutanten 46C, 68C und 251 innerhalb der Grenzen. Um diesen Befund weiter statistisch abzusichern müssen Daten über einen längeren Zeitraum in die biometrische Analyse einbezogen werden.

Der Rohproteingehalt der hier untersuchten Rekombinanten ist im Vergleich zu dem der Eltern recht unterschiedlich. Betrachtet man die Kreuzung 489C x 46C, so haben die Samen zweier Rekombinanten einen höheren Rohproteingehalt als beide Eltern und eine den gleichen Wert wie die Mutante 46C. Bei der Kreuzung 489C x 176A sieht es anders aus. Hier haben die Samen zweier Rekombinanten den gleichen Rohproteingehalt wie der eine Elter, bei der dritten liegt er unter dem beider Eltern. Die dritte Kreuzung mit Mutante 489C zeigt noch wieder andere Verhältnisse. Zwei der Rekombinanten weisen einen Rohproteingehalt der Samen auf, der zwischen dem für die beiden Eltern bestimmten liegt und die dritte Rekombinante hat Samen, deren Rohproteingehalt im Niveau über dem der beiden Eltern liegt. Die Interpretation der Verhältnisse bei Kreuzungen mit Mutante 489C bereitet besondere Schwierigkeiten, weil dies keine Ein-Gen-Mutante ist, sondern hier eine Mutation in mindestens 8 Genen erfolgte (GOTTSCHALK 1972a).

Bei den Kreuzungen mit Mutante 68C handelt es sich um solche mit Ein-Gen-Mutanten. Die Rekombinante R312 (68C x 46C) hat den gleichen Samenproteingehalt wie beide Eltern. Dies ist nicht überraschend, weil sich die beiden Mutanten im Rohproteingehalt der Samen auch nicht unterscheiden, obwohl auch eine additive oder multiplikative Wirkung nicht auszuschließen gewesen wäre. Bei der Kreuzung 68C x 176A (Rekombinante R328) haben die Samen der Rekombinanten den gleichen hohen Rohproteingehalt wie der eine Elter. Bei der Kreuzung 68C x 1201A (R354) ist es genau umgekehrt; hier hat die Rekombinante den gleich niedrigen Wert im Samenrohproteingehalt wie der eine Elter; in beiden Fällen aber nicht den des Elters 68C.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß gezielte Kreuzungen auf hohen Rohproteingehalt der Samen nicht auf irgendeine Weise möglich sind. Es ist immer zu berücksichtigen, daß nicht

nur das mutierte Gen wirksam wird, sondern daß in einem bestimmten genetischen Umfeld die Ausprägung anders aussehen kann. Es tritt in Kombination mit anderen Genen und kann daher nicht isoliert betrachtet werden.

Bei der Ermittlung des Eiweißertrages einer Sorte ist von Interesse, wie groß die Pflanzendichte maximal sein darf, ohne daß sich das Tausendkorngewicht oder die Samenzahl pro Pflanze bzw. der Proteingehalt der Samen negativ verändern (vgl. dazu HIEMKE 1973). Die Abhängigkeit der Eiweißproduktion von der Pflanzendichte bei Pisum sativum ist von HIEMKE (1973) untersucht worden. Dabei zeigte sich, daß keine Beziehung zwischen Bestandsdichte und dem Stickstoffgehalt - und damit Rohproteingehalt - der Samen vorliegt. Hingegen ergab sich (HIEMKE 1973), daß der Stickstoffgehalt der Samen sinkt, wenn die Kornzahl pro Hülse steigt. Informationen über die Stärke der Beziehung zwischen den Größen "Kornertrag" (= Samengewicht pro Pflanze) und "Rohproteingehalt" fehlen noch. Die für die Ausgangsform vorliegenden Daten lassen auf eine negative Korrelation schließen (eigene Berechnungen), d.h. bei steigendem Kornertrag sinkt der Rohproteingehalt.

Neben diesen Faktoren ist bei der Bearbeitung von Mutanten hinsichtlich ihres Proteingehaltes auch noch auf andere Einflüsse wie z.B. Klima und Bodenverhältnisse hinzuweisen. Diese allein machen schon eine Züchtung auf "Proteinertrag" schwierig. Weiter ist dann auch noch zu fragen, ob Rohprotein gleich verdaulichem Protein ist.

Die Selektion auf hohen Eiweißertrag kann nur dann uneingeschränktes Züchtungsziel sein, wenn eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Rohprotein einerseits und an verdaulichem und biologisch wertvollem Eiweiß andererseits besteht. Untersuchungen an Zuchtmaterial haben ergeben, daß dies bei Leguminosen der Fall ist (ROEMER, RUDORF 1958). Dabei ergaben sich zwar deutliche Unterschiede zwischen den Zuchtstämmen derselben Art; im allgemeinen verläuft aber der verdauliche Anteil mit dem Rohproteingehalt konform.

Auch in Bezug auf die biologische Wertigkeit zeigt sich bei diesem Material ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Arten und Zuchtstämmen derselben Art. Bis auf diese Stammesunterschiede werden in erster Linie auf mengenmäßige Variabilität der einzelnen Komponenten des Reserveproteinkomplexes zurückgeführt (ROEMER, RUDORF 1958; BAJAJ et. al. 1970).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Methionin- und Lysingehalt der Samenproteine untersucht. Besonders vom Methioningehalt kann bei Erbsen auf die biologische Wertigkeit des Samenproteins geschlossen werden.

Es zeigte sich, daß Mutanten und Rekombinanten gegenüber der Ausgangsform vollzählig einen höheren Methioningehalt aufweisen. Dies trifft sowohl in Bezug auf eine konstante Menge Samenmehl als auch im Hinblick auf den Methioninanteil am Rohprotein zu (vergl. Abb. 9 und 10 Seite 55 und 57).

Die Ergebnisse sind nicht leicht zu interpretieren. Denkbar wäre eine Erhöhung des Mengenanteils von freiem Methionin in den Samen gegenüber der Ausgangsform, die eventuell auf eine Störung des Synthesewegs beim Methionin durch die Einwirkung der Mutation zurückzuführen ist. Demgegenüber ist einzuwenden, daß in allen Mutanten, die in unterschiedlichen Genen mutiert sind, gleiche Veränderungen auftreten. Außerdem ist freies Methionin in ausgereiften trockenen Leguminosensamen nur in Spuren nachzuweisen (1,6 % des gesamten Methioningehaltes, nach JONES, BOULTER 1968). Eine Erhöhung um 12 % bis 54 % pro 100 mg Samenmehl gegenüber der Ausgangsform ist auch aus diesem Grunde mit einem Anstieg des Anteils an freiem Methionin in den Samen der Mutanten und Rekombinanten nicht zu erklären.

Die Änderung der Aminosäurefrequenz, d. h. die Aufeinanderfolge der Aminosäuren, die genetisch festgelegt ist, eines einzelnen Proteins kann ebenfalls kaum den Unterschied von 0,51 % (= 100 %) Methioninanteil am Rohprotein bei der Ausgangsform gegenüber 0,57 % bei Mutante 176A und Rekombinante R328 (niedrigster Methioninanteil am Rohprotein bei den untersuchten

Genotypen) bzw. 0,78 % bei Rekombinante $R18_{52}$ (höchster Methioninanteil am Rohprotein bei den untersuchten Genotypen)erklären. Der Methioninanteil am Rohprotein ist bei allen untersuchten Mutanten und Rekombinanten um mindestens 12 % bis zu 53 % im Vergleich zur Ausgangsform erhöht.

Eine weitere Erklärung für die Erhöhung des Methioningehaltes der Samen ist die Veränderung der Mengenanteile der Einzelproteine am Gesamtprotein des Samens. Die Samenproteine der Erbsen setzen sich aus Globulinen und Albuminen zusammen. Die Albumine sind vorwiegend Enzyme, sie enthalten mehr essentielle Aminosäuren als die Globuline. Ihre Zusammensetzung ist dem Standardprotein von SMITH (1966) ähnlich. Bei den Globulinen handelt es sich vorwiegend um Reserveproteine, ihre Klassifizierung richtete sich aufgrund fehlender enzymatischer Aktivität nach dem Löslichkeitsverhalten in Wasser, verdünnten Salzlösungen, schwachen Säuren oder Alkalien. Danach wurden die Globuline der Erbse unterteilt in Legumin und Vicilin. Mit modernen Trennungsverfahren konnten diese, scheinbar homogenen Proteine, in zahlreiche Komponenten zerlegt werden (KINDL, WÖBER 1974). Es ist daher durchaus vorstellbar, daß durch Mutation eine Proteingruppe verändert wird, d. h. für die hier vorliegenden Fälle könnte man annehmen, daß eine Proteingruppe oder mehrere bei den Mutanten und Rekombinanten im Vergleich mit denen der Ausgangsform eine andere Zusammensetzung aufweisen. Die Veränderung kann quantitativ sein (erhöhte Synthese einer methioninreichen Proteingruppe) oder qualitativ (Synthese einer methioninreichen Proteingruppe zusätzlich oder anstelle einer anderen Proteingruppe). Hierbei gilt es allerdings zusätzlich zu bedenken, daß bei den Rekombinanten fast immer gleich hohe Werte für den Methioninanteil am Rohprotein festgestellt wurden, wie sie bei den Eltern ermittelt worden sind. Daraus ergibt sich als Folge, daß der Methioninanteil auch bei unterschiedlichem Rohproteingehalt von Elter und Rekombinante an die Rekombinante weitergegeben wird.

Nach Untersuchungen von MÜLLER (1973) sowie GOTTSCHALK und MÜLLER (1974) ist bei den untersuchten Mutanten 46C, 68C, 176A,

1201A und Rekombinanten R312, R328 und R354 eine Erhöhung des Methioninanteils am Rohprotein im Vergleich zur Ausgangsform nicht feststellbar. Untersuchungen über den Albumingehalt der genannten Genotypen ergaben, daß auch hier die für die Mutanten und Rekombinanten erhaltenen Ergebnisse unterhalb des für die NF festgestellten Wertes lagen (MÜLLER 1973). Daraus ergibt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Albumingehalt und Methioninanteil am Rohprotein besteht, d.h. ob eine Erhöhung des Albumingehaltes mit einem Anstieg des Methioninanteils am Rohprotein verbunden ist,bzw. ob ein Teil des höheren Methioningehaltes durch den Anstieg des Albumingehaltes zu erklären ist.

Vergleicht man die hier untersuchte Erbse Pisum sativum mit anderen Leguminosen, so stellt man fest, daß die Ausgangsform in Bezug auf den Methioninanteil am Rohprotein im Vergleich zu den anderen Leguminosen mit am niedrigsten liegt. Die Mutanten und Rekombinanten weisen nach MÜLLER (unveröffentlicht) noch geringere Werte auf. Die in dieser Arbeit untersuchten Genotypen zeigen allerdings Werte, die von der Ausgangsform positiv abweichen, d. h. alle Mutanten und Rekombinanten zeigen sowohl einen höheren Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl als auch einen höheren Methioninanteil am Rohprotein als die Ausgangsform (vergl. Abb. 9 Seite 55 und Abb. 10 Seite 57).

Neben Methionin wurde in der vorliegenden Arbeit der Lysingehalt bei den untersuchten Genotypen ermittelt, weil diese basische Aminosäure als Baustein in vielen Eiweißstoffen vorkommt. Im Gegensatz zu Methionin hat Lysin im Stoffwechsel keine speziellen Aufgaben.

Lysin kann auf zwei unterschiedlichen Wegen gebildet werden. Bei höheren Pflanzen ist die Vorstufe zur Lysinbildung die Ketoglutarsäure.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß alle Genotypen mit Ausnahme der Ausgangsform und zwei Rekombinanten in einer konstanten Menge Samenmehl die gleiche Menge Lysin aufweisen (vergl. Abb. 11 Seite 61). Der Lysinanteil am Rohprotein ist

bei den einzelnen Genotypen unterschiedlich und steht in Zusammenhang mit dem Rohproteingehalt (vergl. Abschnitt 5.5).

Es konnte festgestellt werden, daß der Lysinanteil am Rohproteingehalt bei einer Mutante und einigen Rekombinanten (176A, R20D, $R98_{61}$, R224, R328) niedriger liegt als bei der Ausgangsform. Diese Gruppe bildet aber mit den Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$ diejenigen Genotypen,die den höchsten Rohproteingehalt pro 100 mg Samenmehl aufweisen (vergl. Abschnitt 5.2.). Mutanten und Rekombinanten, die in Bezug auf den Rohproteingehalt in die gleiche Gruppe fallen wie die Ausgangsform (46C, 68C, 251, R78, $R18_{52}$, R177 Typ B, R312), haben einen der Ausgangsform gegenüber um 5 % bis 9 % höheren Lysinanteil am Rohprotein.

Die Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$ haben trotz des hohen Rohproteingehaltes einen Lysinanteil am Rohprotein, der über dem der Ausgangsform liegt. Wie die Regressionsgerade (siehe Abschnitt 5.5.), die die Beziehung Rohproteingehalt - Lysinanteil darstellt, zeigt, liegt der größte Teil der hier untersuchten Genotypen innerhalb der Vertrauensgrenzen dieser Regressionsgeraden. Während die Rekombinanten $R18_{37}$ und $R98_{81}$ "positive" Korrelationsbrecher sind, liegt die Ausgangsform weit unterhalb der Vertrauensgrenzen, und gilt daher als "negativer" Korrelationsbrecher.

Zu klären ist die Frage nach der konstanten Menge Lysin pro 100 mg Samenmehl die bei allen Genotypen mit Ausnahme der Ausgangsform und den Rekombinanten $R98_{81}$ und $R18_{37}$ festgestellt wurde. Denkbar wäre, daß eine konstante Menge an Lysin synthetisiert wird, unabhängig von dem Bedarf für die Proteinsynthese. Das hätte zur Folge, daß Genotypen mit niedrigem Proteingehalt einen hohen Anteil an freiem Lysin und umgekehrt Genotypen mit hohem Proteingehalt einen niedrigen Anteil an freiem Lysin aufweisen. Nach Untersuchungen von JONES und BOULTER (1968) sind in den Samen von Pisum sat vum 7,13 % des Lysingehaltes der Samen freies Lysin. Bei den untersuchten Mutanten und Rekombinanten scheint eine größere Menge an Lysin synthetisiert zu werden. Dabei könnte bei einem der Reaktions-

schritte innerhalb der Lysinsynthese der Regelmechanismus gestört sein oder - was wahrscheinlicher ist - die Regulation der zu synthetisierenden Menge zugunsten einer Mehrproduktion verschoben sein.

Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen ist festzustellen, daß die Korrelation Rohproteingehalt - Lysinanteil am Rohprotein auf der konstanten Menge Lysin pro 100 mg Samenmehl beruhen muß. Der unterschiedliche Lysinanteil am Rohprotein ist demnach durch den unterschiedlichen Gehalt an Rohprotein bei den einzelnen Genotypen bedingt.

Die beiden in dieser Untersuchung ermittelten Aminosäuregehalte des Samenproteins der Erbse - vor allem der Methioninanteil - zeigen auch einen direkten Bezug zur praktischen Anwendung: die ernährungsphysiologische Bedeutung eines Proteins findet seinen Ausdruck in der biologischen Wertigkeit. Mit dieser Bezeichnung ist ein Maß für den Wert der Eiweißstoffe im Hinblick auf die Lebensfunktionen des menschlichen und tierischen Organismus geschaffen worden. Die biologische Wertigkeit ist abhängig von dem Gehalt an essentiellen Aminosäuren. Dabei wird der Wert des Proteins in erster Linie von der limitierenden Aminosäure, d. h. von der im Minimum befindlichen Aminosäure bestimmt. Bei Leguminosen ist diese das Methionin (LANG 1970).

In Tabelle 15 wird die nach dem "Chemical Score" (LANG 1970) berechnete biologische Wertigkeit der Samenproteine der hier untersuchten Genotypen dargestellt. Diese Werte können allerdings nur als Anhaltspunkt aufgefaßt werden. Sie sollen zeigen, wie sich durch Änderung des Methioninanteils am Protein dessen biologische Wertigkeit ändert.

Die hier aufgeführten Daten beruhen auf dem Methioninanteil am Rohprotein. HIEMKE (1973) und WOLFF (1973) beziffern den "Reinproteingehalt" mit 80 % bis 84 % des Rohproteingehaltes. Das würde bedeuten, daß der prozentuale Anteil des Methionins am "Reinprotein" höher liegen könnte und die berechnete biologische Wertigkeit demnach also ebenfalls höher wäre.

Tabelle 15 : Biologische Wertigkeit des Proteins der untersuchten Mutanten und Rekombinanten - absolut und in % der NF berechnet nach dem Chemical Score

Genotyp	biologische Wertigkeit absolut	in % der NF
NF	48,14	100,00
46C	49,99	103,84
68C	49,99	103,84
176A	49,37	102,56
251	52,65	109,37
489C	52,44	108,93
1201A	51,01	105,96
$R18_{37}$	51,62	107,23
$R18_{52}$	53,67	111,49
R20D	51,82	107,64
R78	52,03	108,08
$R98_{61}$	52,24	108,52
$R98_{81}$	52,65	109,37
R163	52,85	109,78
R177 Typ B	52,44	108,93
R224	50,40	104,69
R312	49,78	103,41
R328	49,37	102,56
R354	51,82	107,64

Da der Methioninanteil am Rohprotein in der eigenen Untersuchung bei allen Mutanten und Rekombinanten im Vergleich zur Ausgangsform höher ist, liegt auch die biologische Wertigkeit bei allen Genotypen höher als die der Ausgangsform.

LANG (1970) gibt für die biologische Wertigkeit von Erbsen einen berechneten Wert von 58 und einen gefundenen von 48 für Ratten und einen von 56 für den Menschen an. Danach haben die

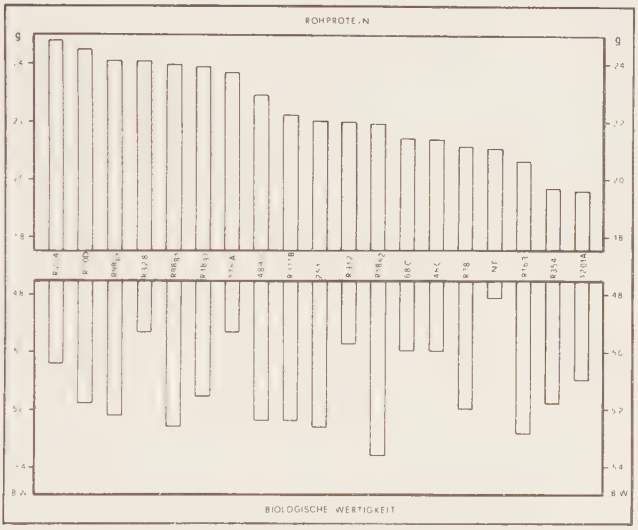
hier untersuchten Genotypen eine biologische Wertigkeit, die um 2,29 % ($R18_{52}$) bis 17 % (NF) unter der von LANG (1970) für Erbsen berechneten liegt. Da nicht angegeben ist, um welche Erbsenart es sich handelt, muß der angegebene Wert als Durchschnitt betrachtet werden. Bei den untersuchten Mutanten und Rekombinanten ist, wie Tabelle 10 zeigt, eine bis zu 11,49 %ige Erhöhung der biologischen Wertigkeit festgestellt worden.

Die Proteinqualität verschiedener Erbsenarten haben BAJAJ et al. (1971) untersucht. Sie kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die biologische Wertigkeit der Samenproteine unterschiedlich ist. Zwischen Proteinquantität und -qualität besteht kein Zusammenhang. Erbsenarten mit gleichem Rohproteingehalt können große Unterschiede in der biologischen Wertigkeit ihrer Samenproteine haben. Dieses soll in Abbildung 25 anhand der eigenen Daten bestätigt werden. In der Abbildung sind die Rohproteingehalte und die jeweilige nach dem "Chemical Score" berechnete biologische Wertigkeit für die hier untersuchten Genotypen eingezeichnet.

Dabei werden die Genotypen nach fallendem Rohproteingehalt angeordnet.

In der Tierernährung hat man Versuche durchgeführt und neben Getreide auch Samen von proteinreichen Leguminosen eingesetzt. So dient Soja schon seit langer Zeit als bedeutende Proteinquelle in der tierischen Ernährung, da zwischen Getreide- und Leguminosenprotein ein guter Ergänzungswert besteht. In seinem Vortrag über "Alternative Eiweißquellen für die Versorgung der Viehbestände in der europäischen Gemeinschaft" weist CORNELISSEN (1974) auf den auch in Zukunft nicht auszuschließenden Eiweißmangel auf dem Weltmarkt und als Folge davon insbesondere für den Raum der EG hin. 90 % der eiweißreichen Grundstoffe für Futtermittel müssen eingeführt werden. Mit 20 % wird ungefähr die Hälfte des Eiweißangebotes in Geflügel- und Schweinefuttermitteln aus Soja geliefert. Die andere Hälfte stammt hauptsächlich aus Getreide und Getreidenebenprodukten. Potentielle Sojaersatzstoffe müssen sich vor allem durch einen

Abbildung 25: Rohproteingehalt und biologische Wertigkeit des Samenproteins der untersuchten Mutanten und Rekombinanten von Pisum sativum



hohen Lysingehalt auszeichnen. In diesem Zusammenhang wird auf die Ausdehnung des Ackerbohnen- und Erbsenanbaus hingewiesen. Die Züchtung von Sorten mit hohem Ertrag und qualitativ gutem Protein ist daher von großer Bedeutung. Die bisherigen Erträge reichen nicht aus, bei "normalen" Preisen für Soja wirtschaftlich konkurrenzfähig zu sein. EGGUM (1972) berichtet über Versuche von HANSEN (1970) in denen Erbsen an Schlachtschweine in Konzentrationen bis zu 30 % im Futter verfüttert und keine signifikanten Unterschiede im Zuwachs und Futterverbrauch festgestellt wurden. Erbsen sind also ein durchaus einsetzbares Futtermittel. Auch im ABC der Futtermittel (JAHN, WETTERAU, LEISNER 1968) werden Erbsen als hochverdauliches und wertvolles, eiweißreiches Futtermittel be-

zeichnet, welches auch durch das Fehlen von Bitterstoffen für alle Tierarten geeignet ist.

Auch für den Bereich der menschlichen Ernährung laufen Untersuchungen, wie tierisches Eiweiß durch pflanzliches, z. B.Sojaprotein, zu ersetzen bzw. zu ergänzen ist. Wichtig ist, daß die pflanzlichen Proteine eine Aminosäurezusammensetzung besitzen, die geeignet ist, in Mischungen mit Getreideproteinen eine gute Ergänzungswirkung zu erzielen, um so das Proteingemisch ernährungsphysiologisch wertvoller zu machen (EGGUM 1972, CORNELISSEN 1974). Die Selektion von Erbsen, deren Protein biologisch wertvoll ist, hat also durchaus eine praktische wirtschaftliche Bedeutung.

7. Zusammenfassung

Aus der vorliegenden Arbeit kann folgendes Facit gezogen werden:

1. Die mikrobiologische Aminosäurebestimmung erweist sich als zuverlässige Methode. Sie ist besonders geeignet für Untersuchungen, in denen in einer großen Anzahl von Proben einige oder wenige Aminosäuren zu bestimmen sind.

2. Statistische Auswertungen erfüllen hier den Zweck, konkrete und abgesicherte Aussagen über Unterschiede und Gemeinsamkeiten innerhalb des Untersuchungsmaterials machen zu können.

3. Die Ergebnisse dieser Untersuchung geben Auskunft über den Rohprotein-, Methionin und Lysingehalt der Samen verschiedener Mutanten und Rekombinanten von Pisum sativum.

4. Der Rohproteingehalt der Mutanten ist im Vergleich zur Ausgangsform unverändert, höher oder niedriger.
   Er ist bei allen Rekombinanten im Vergleich zu dem der Eltern höher, niedriger, gleich oder liegt zwischen dem für die Eltern gefundenen Wert.

5. Der Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl und der Methioninanteil am Rohprotein liegen bei den untersuchten Genotypen höher als der Vergleichswert der Ausgangsform.
   Alle Rekombinanten weisen einen höheren oder zwischen den Eltern liegenden Wert für den Methioningehalt pro 100 mg Samenmehl auf. In keinem Falle ist er niedriger als der der Eltern.

6. Der Lysingehalt pro 100 mg Samenmehl hat bei den untersuchten Genotypen bis auf die Ausgangsform und zwei Rekombinanten die gleiche Höhe; die Ausgangsform zeigt innerhalb der untersuchten Genotypen den geringsten Lysingehalt.
   Der Lysinanteil am Rohprotein bewegt sich bei den Mutanten und Rekombinanten auf einem höheren Niveau als bei der Ausgangsform.

Zwischen Rohprotein und Lysinanteil am Rohprotein konnte daher eine Korrelation festgestellt werden.

7. Bei der Wertung von Nutzpflanzen müssen Ertrag und Tausendkorngewicht neben anderen Faktoren auch mit einbezogen werden. Die Beurteilung der Samenqualität läßt sich nicht nach einem generellen Schema vornehmen. Sie muß je nach Fragestellung unter einem anderen Aspekt erfolgen.

8. Die Einbeziehung von Rekombinanten in vergleichende Untersuchungen ist besonders sinnvoll, da durch sie festgestellt werden kann, ob und wie sich durch Mutation aufgetretene Merkmalsveränderungen bei Neukombinierung der Gene manifestiern.

8. Literaturverzeichnis

ABC BIOLOGIE: Hrsg. G. Dietrich, F.W. Stöcker
Verlag Harri Deutsch, Frankfurt a.M. und Zürich 1968

AMBROSE, E.J. und EASTY, D.M.: Zellbiologie
Verlag Chemie, Weinheim / Bergstraße 1974

BAJAJ, S., MICKELSEN, O., LILLEVIK, H.A., BAKER, L.R., BERGEN, W.G.: Prediction of protein efficiency ratio of peas from their albumin content
Michigan Agricultural Experiment Station Journal Article No 4909, 1970

BAJAJ, S., MICKELSEN, O., BAKER, L.R., MARKARIAN, O.: The quality of protein in various lines of peas
Br. J. Nutr. 25, 1971, S. 207-212

BARTON-WRIGHT, E.C.: The microbiological essay of the vitamin B-complex and the amino acids
Sir Isaac Pitman & Sons, LTD, London 1952

BLAND, F.B.: Crop production: Cereals and legumes
Academic Press, London, New York 1971

BLOCK, R.J. und WEISS, K.W.: Amino acid handbook
Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA, 1956

BORGSTROM, G.: Der hungrige Planet
Bayrischer Landwirtschaftsverlag, München 1967

BRESCH, C. und HAUSMANN, R.: Klassische und molekulare Genetik
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970

BREWBAKER, J.L.: Angewandte Genetik
Gustav Fischer Verlag, Jena 1967

BROCKHAUS ABC CHEMIE in zwei Bänden
VEB T.A. Brockhaus Verlag, Leipzig 1971

CARPENTER, K.J.: Nutritional consideration in attemps to change the chemical composition of crop
Proc. of the Nutrition Society, 29, 1970, S. 3-11

CORNELISSEN, J.P.: Alternative Eiweißquellen für die Versorgung der Viehbestände der Europäischen Gemeinschaft
In: Kraftfutter, Alfred Strothe Verlag, Hannover
Heft 5, 1974, S. 182-188

DÜMKE, B.: Untersuchungen über die Eiweißzusammensetzung einiger Mutanten und Rekombinanten von Pisum sativum
Dissertation Bonn 1973

EGGUM, B.O.: Die Qualität von Pflanzenproteinen beurteilt durch Aminosäureanalysen und biologische Versuche
Landwirtschaftliches Versuchslaboratorium Abteilung für Tierphysiologie und Chemie, Kopenhagen

EVANS, R.J. und BANDMER, S.L.: Nutrive value of legume seed proteins
J. Agr. Food Chemistry, Vol. 15, No 3, 1967, S. 439

GEIßLER, E.: Meyers Taschenlexikon Molekularbiologie
VEB Bibliographisches Institut, Leipzig 1972

GELLERT, W., KÜSTNER, H., HELLWICH, M., KÄSTNER, H.: Kleine Enzyklopädie Mathematik
VEB Bibliographisches Institut, Leipzig 1968

GOTTSCHALK, W.: Die Wirkung mutierter Gene auf die Morphologie und Funktion pflanzlicher Organe dargestellt an strahleninduzierten Mutanten von Pisum sativum
Botanische Studien Heft 14, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1964

GOTTSCHALK, W.: Die Kombinantion mutierter Gene
Biologisches Zentralblatt Bd 91, Heft 1, 1972a,
S. 91-109

GOTTSCHALK, W.: Harmonische und disharmonische Genkombination in der Mutationszüchtung
Z. Züchtung 67, 1972b, S. 221-232

GOTTSCHALK, W. und MÜLLER, H.P.: Monogenetic alteration of seed protein content and protein pattern in x-ray inducted Pisum mutants

Reprint from: Improving plant protein by nuclear techniques, ITAL, Wien 1970

GOTTSCHALK, W. und MÜLLER, H.P.: The quantitative and qualitative situation of seed proteins in mutants and recombinants of Pisum sativum
In: Nuclear Techniques for seed Protein Improvement IAEA, Vienna 1973, S. 235-253

GOTTSCHALK, W. und MÜLLER, H.P.: Quantitative and qualitative investigations of the seed proteins of mutants and recombinants of Pisum sativum
Theoretical and Applied Genetics, 45, 1974, S. 7-20

GREENSTEIN, J.P. und WINITZ, M.: Chemistry of the amino acids John Wiley and Sons. Inc., New York, London, Sidney 1961

GULARJEW, E.M.: Bakteriochemie
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958

HARTMANN, P.E. und SUSKIND, S.R.: Die Wirkungsweise der Gene Gustav Fischer Verlag, Jena 1972

HENKE, I.: Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen über den Gehalt an Methionin, Lysin und Prolin in Samen verschiedener Mutanten und Rekombinanten von Pisum sativum
Wissenschaftliche Arbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Bonn 1972

HIEMKE, Ch.: Untersuchungen über den Stickstoffgehalt der Samen einiger strahleninduzierter Mutanten von Pisum sativum in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren
Diplom-Arbeit Bonn 1973

HOFMAN, E.: Intermediärstoffwechsel
Dynamische Biochemie III, Wissenschaftliche Taschenbücher, Akademie-Verlag, Berlin 1971

HORN, M.J., JONES, B., BLUM, A.E.: Microbiological determination of lysine in protein and food
In: J. of Biological Chemistry, Vol. 196, 1947, S. 71-76

HORN, M.J., BLUM, A.E., GERSDORFF, Ch.E.F., WARREN, H.W.:
Sources of error in microbiological determination of amino acids on storage
General Chemistry, Vol. 32, 1955, S. 64-70

JAHN, S., WETTERAU, H., LEISNER, G.: Kleines ABC Futtermittel
VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin 1968

JONES, V.M. und BOULTER, D.: Amino acid analysis of germinating seeds of some members of the Leguminosae
Journal of the Science of Food and Agriculture
Published by the Society of Chemical Industry, Vol.19
London 1968, S. 745-747

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970

KEIL, B. und ŠORMOVA, Z.: Laboratoriumstechnik für Biochemiker
Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1965

KINDL, H. und WÖBER, G.: Biochemie der Pflanzen
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975

KLEIN, K.-A., SCHÖN, W.J., BRUNCKHORST, K.: Die Qualität der Getreideproteine aus der Sicht des Pflanzenzüchters
Qual. Plant.-Pl. Fds. hum. Nutr. XXIII 1/3. 1973
S. 311

KOFÁNYI, E.: Einführung in die Ernährungslehre
Umschau Verlag, Frankfurt a.M. 1970

[illegible]: Seed Biology
Academic Press New York and London, 1967
Vol. I, Importance, Development, Germination

KRETZSCHMAR, H.: Technische Mikrobiologie
Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg, 1968

LANG, K.: Biochemie der Ernährung
Darmstadt 1970

LICHTENSTEIN, H.: Comparisation between the microbiological and ion exchange chromatographic analysis of food

for amino acid content
In: Journal of Agricultural and Food Chemistry No 19
1971, S. 945-956

LILLEVIK, H.A.: The determination of total organic nitrogen
In: M.A. Joslyn: Methods in Food Analysis
Academic Press New York and London 1970

LINDER, A.: Statistische Methoden
Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart 1964

LYMAN, C.M., MOSELY, O., WOOD, S., HALE, F.: The microbiological determination of amino acids - III Methionine
In: Journal of Biological Chemistry Vol. 166, 1946
S. 161-171

LYMAN, C.M., MOSELY, O., WOOD, S., BUTLER, B., HALE, S.: Some chemical factors which influence the amino acid requirements of lactic acid bacteria
In: Journal of Biological Chemistry Vol. 167, 1947,
S. 177-187

MENGEL, K.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1968

METZLER, H.: Biochemie der Pflanzen
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1973

MÜLLER, F.: Fünfstellige Logarithmen und andere mathematische Tafeln
VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1970

MÜLLER, H.P.: Genetic control of the quantitative composition of seed proteins in mutants and recombinants of Pisum sativum
Genetika Vol. 5, No 1, 1973, S. 51-58

MÜLLER, H.P.: Die genetischen Grundlagen der Stoffwechselproduktion bei höheren Pflanzen
Arbeitsanleitung zur Blockübung
Institut für Genetik der Universität Bonn, 1973

MÜLLER, H.P. und BAQUAR, S.L.: Genetically controlled variation in seed protein of some recombinants of x-ray inducted Pisum mutants
Genetika, Vol. 6, No 1, 1974, S. 223-230

MÜLLER, P.H.: Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik - Lexikon
Akademie-Verlag, Berlin 1970

MUNCK, L.: Improvement of nutritional value in cereals
In: Heriditas72, 1972, S.1

MUNCK, L., KARLSSON, K.E., HAGBERG, A.: Selection and characterisation of high protein high lysine variety from barley collection
2nd Int. Barley Genetics Symp., Pullman, Wash. 1969

NELSON, O.E.: Improvement of plant protein quality
In: Improving plant protein by nuclear techniques
Proc. Symp. IAEA, Vienna 1970

NILAN, R.A., KLEINHOFS, A., SIDERIS, E.G.: Structural and biochemical concepts of mutations in flowering plants
In: Inducted mutations in plants, Proc. Symp. IAEA, Vienna 1969, S.35

NEUMANN, R.E.: The amino acid composition of gelatins, collagens and elastins from different sources
In: Archives of Biochemistry Bd 24, 1948, S. 289

PFLANZAGL, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik Bd I, II
Sammlung Göschen, Walter de Greyter & Co, Berlin 1968

RASCH, D.: Mathematische Statistik
VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin 1970

ROEMER, Th., RUDORF, W.: Handbuch der Pflanzenzüchtung Bd 1
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg 1958

SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1972

SCHLEGEL, H.: Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1972

SCHÖN, W.J.: Analysis of proteins and amino acids in protein-rich barley strains
IAEA, Vienna 1970, S. 265

SCHOPFER, H.: Plants and vitamins
Waltkamp, Mass., USA, 1949

SCHWENGER, M.-Th.: Genmutation und innerartliche Variabilität
Wissenschaftliche Arbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt am Gymnasium, Bonn 1975

SCHWERDTFEGER, E.: Vergleich der mikrobiologischen und säulenchromatographischen Bestimmung von Aminosäuren
Zeitschrift für analytische Chemie Bd 234, 1968

SMITH, M.H.: The amino acid composition of proteins
Journal of Theoretical Biologie Vol. 13, 1966, S.261

SNELL, E.E.: The microbiological essay of amino acids
Advances in Protein Chemistry Vol II, 1945, S.85-118

SPERLICH, D.: Populationsgenetik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973

TAIRA, H.: Amino acid composition of different varieties of foxtail millet (Setaria italica)
In: Agricultural and Food Chemistry Vol. 16, No 6, 1968, S. 1025-1027

TAIRA, H.: Amino acid pattern of gras seed and systematics
In: Proceedings of the Japan Society of Plant Taxonomists, Vol. 7, No 2, March 1, 1968, S. 14-17

TANAKA, S.: Some useful mutations inducted by gamma irradiation in rice
In: Inducted Mutations in Plants, Proc. Symp. IAEA, Vienna 1969, S. 517

THIMANN, K.V.: Das Leben der Bakterien
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1964

VILAWAN, S. und SILDIG, B.A.: Study on mutational manipulation of proteincharacteristic in rice
Theoretical and Applied Genetics 43, 1973, S. 276

WEILING, F.: Einführung in die Statistik und Biometrie
Scriptum zur gleichnamigen Vorlesung, Bonn 1972

WINKEL, A. Die Bakterienzelle
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1956

WOLLF, G.: Untersuchung der Proteingehalte der Samen verschiedener Mutanten und Rekombinanten von Pisum sativum
1973 (unveröffentlicht)

ZIMMERMANN, K.F.: Kompedium der Variationsstatistik
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1959

ZIMMERMANN, K.F.: Tafeln, Tabellen und Formeln zur Variationsstatistik
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1959

Danksagung:

Herrn Prof. Müller möchte ich für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.
Herrn Prof. Gottschalk danke ich für zahlreiche Anmerkungen.
Den Assistenten und Mitarbeitern des Instituts bin ich für vielfältig gewährten Rat sehr zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Geboren am 8.7.1948 in Vlotho als Tochter der Eheleute Günter Henke und Frau Elisabeth, geb. Sonntag.
1955 Einschulung in die Volksschule Dankersen bei Minden, nach drei Monaten Wechsel zur Hafenschule und anschließend zur Heideschule in Minden.
1959 Besuch des Städt. Neuspr. Mädchengymnasiums mit Gymnasium für Frauenbildung in Minden. 1968 Abschluß der Schulausbildung mit dem Abitur.
Vom Wintersemester 1968/69 bis zum Wintersemester 1972/73 Studium der Fächer Biologie und Ökotrophologie an der Universität Bonn. Erste Staatsprüfung für das Lehramt am Gymnasium am 12. April 1973 für das Fach Biologie, Erweiterungsprüfung für das Fach Ökotrophologie am 27. April 1973.
Vom 1. Mai 1973 bis 30. April 1975 Tätigkeit am Institut für Genetik der Universität Bonn als wissenschaftliche Hilfskraft.
Seit dem 1. Juni 1975 im Vorbereitungsdienst für das Lehramt am Gymnasium.
Verheiratet mit Hubert Grote seit dem 17. August 1973.

Bonn, den 18. Mai 1976